

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA DE CASSIA PINTO FERREIRA

**INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIPROLIFERATIVA
DE NANOPARTÍCULAS DE OURO**

CURITIBA

2017

JULIANA DE CASSIA PINTO FERREIRA

**INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTIPROLIFERATIVA DE NANOPARTÍCULAS DE OURO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina da Universidade Federal do Paraná como requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Cabrini de Almeida

Coorientadora: Msc. Priscila Lúcia Pawloski

CURITIBA
2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, acima de tudo, por todas as bênçãos que me concede e por ter me dado força durante todo esse percurso.

Aos meus pais, Marcelo e Patrícia, e irmã Vitória, por sempre me incentivarem, em todos os aspectos da minha vida, a melhorar cada dia mais e evoluir. Eu não seria nada sem vocês.

Aos meus orientadores Daniela Cabrini e Michel Otuki, pela confiança, orientação e por terem aberto seu laboratório para mim.

À minha coorientadora Priscila Pawloski por ter me coorientado com tanto afinco, estar sempre presente e por todo o auxílio que me deu. Saiba que a 'filhotinha' aqui é muito grata pelos ensinamentos e conselhos que me deu.

À Gabriela Kozuchovski por ter me apresentado às nanopartículas de ouro e pelo seu fornecimento.

A todos do Laboratório de Farmacologia e Fisiopatologia da Pele da UFPR: Ana Clara, Angélica, Carol Dadalt, Carol Perini, Fernanda, Margareth e Thalita por esses anos de iniciação científica e conclusão de curso. Em especial, à Bruna, por toda ajuda que me deu.

A todos os professores e funcionários da Universidade Federal do Paraná pela competência no trabalho.

Aos meus amigos e colegas de curso por todo o apoio, momentos alegres e conselhos nos momentos de dificuldades.

E, por fim, meu agradecimento especial a todos os meus filhotinhos, os camundongos, que nos auxiliam na busca pela ciência e novos conhecimentos.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

A psoríase é uma doença inflamatória crônica que se manifesta através de lesões cutâneas demarcadas, elevadas e eritematosas e de tamanhos variados. Essa doença é ocasionada por uma hiperproliferação dos queratinócitos, devido a fatores genéticos (associada a antígenos de histocompatibilidade, por exemplo), ambientais (tais como traumas e estresse) e imunológicos (imunidade inata e adquirida). Acomete igualmente homens e mulheres, podendo estar associada a doenças como artrite e doença de Crohn. Devido aos efeitos adversos sistêmicos, elevado custo e a dificuldade na eficácia das terapias atuais, o grande desafio do tratamento é encontrar um medicamento que promova a remissão das lesões sem reduzir a qualidade de vida do paciente. As nanopartículas de ouro (AuNPs) são investigadas para uma ampla variedade de aplicações biomédicas devido a sua biocompatibilidade, facilidade de conjugação com biomoléculas e propriedades terapêuticas em alguns processos inflamatórios. Porém essa atividade anti-inflamatória não foi investigada em um modelo de inflamação cutânea. Sendo assim, esse estudo tem como objetivo avaliar a atividade anti-inflamatória e antiproliferativa das nanopartículas de ouro no modelo de inflamação crônica de pele, induzida por acetato de 12-O-tetradecanoylphorbol (TPA) em camundongos e através de ensaios *in vitro* com queratinócitos HaCat. Observou-se nos experimentos *in vivo* que os animais tratados com AuNPs não apresentaram diferença estatística quando comparados com o grupo TPA na avaliação do edema de orelha, na atividade das enzimas MPO e NAG e na análise histológica, indicando que as AuNPs podem não modificar os parâmetros inflamatórios de edema e de aumento da atividade das enzimas indicadoras de infiltrado leucocitário nos tecidos inflamados. Quanto aos resultados *in vitro*, a AuNPs não alteraram a viabilidade celular nas concentrações de 0,3 a 10 mg/mL, mas reduziram a viabilidade em 43,25% na concentração de 30 mg/mL. No ensaio de proliferação celular, o tratamento com AuNPs também não foi capaz de alterar a proliferação dos queratinócitos nas concentrações testadas. Os resultados encontrados apontam que as AuNPs não possuem efeitos anti-inflamatórios no modelo *in vivo* estudado, como também não apresentam efeitos antiproliferativos nos ensaios *in vitro* realizados, nas condições testadas.

Palavras-chave: Nanopartículas de ouro, edema de orelha, Inflamação.

ABSTRACT

Psoriasis is a chronic inflammatory disease manifested by marked, elevated and erythematous cutaneous lesions of varying sizes, caused by hyperproliferation of keratinocytes, due to genetic (associated with histocompatibility antigens, for example), environmental (such as trauma and stress) and immunological (innate and acquired immunity) factors. It affects equally both men and women and may be associated with diseases such as arthritis and Crohn's disease. Due to the systemic adverse effects, high cost and the low effectiveness of current therapies, the great challenge of the treatment is to find a medicine that promotes the remission of injuries without reducing the quality of life of the patient. Gold nanoparticles (AuNPs) are investigated for a wide variety of biomedical applications due to its biocompatibility, ease conjugation with biomolecules and therapeutic properties in some inflammatory processes. However, this anti-inflammatory activity was not investigated in a cutaneous inflammation model. Thus, this study aims to evaluate the anti-inflammatory and antiproliferative activity of gold nanoparticles in the chronic skin inflammation model induced by 12-O-tetradecanoylphorbol acetate (TPA) in mice and through *in vitro* assays with HaCaT keratinocytes. It was observed in the *in vivo* experiments that the AuNPs treated animals had no statistical difference when compared to the TPA group in the assessment of ear edema, MPO and NAG enzyme activity and in the histological analysis, showing that the AuNPs may not modify the inflammatory parameters of edema and increased activity of leukocyte infiltrating indicator enzymes in inflamed tissues. As for the *in vitro* results, AuNPs did not alter cell viability at concentrations of 0.3 to 10 mg/mL, but reduced the viability by 43.25% at the concentration of 30 mg/mL. In the cell proliferation assay, treatment with AuNPs was also not able to change the proliferation of keratinocytes at the concentrations tested. The results show that AuNPs have no anti-inflammatory effects in the *in vivo* model studied, nor do they have antiproliferative effects in the *in vitro* assays performed under the conditions tested.

Keywords: Gold nanoparticles, Ear edema, Inflammation

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 JUSTIFICATIVA	9
1.2 OBJETIVOS	9
1.2.1 Objetivo Geral	9
1.2.2 Objetivos Específicos	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 PELE	10
2.2 PSORÍASE	13
2.3 NANOPARTÍCULAS DE OURO	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO	20
3.2 ANIMAIS	21
3.3 EDEMA DE ORELHA	21
3.4 INFLAMAÇÃO CUTÂNEA INDUZIDA PELA APLICAÇÃO MÚLTIPLA DE TPA - MODELO DE INFLAMAÇÃO CRÔNICA	22
3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MIELOPEROXIDASE (MPO) E DA N- ACETIL-B-D GLUCOSAMINIDASE (NAG)	23
3.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA	23
3.7 CULTIVO DE QUERATINÓCITOS HACAT	24
3.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS AUNPS NA VIABILIDADE CELULAR DE QUERATINÓCITOS HACAT PELO ENSAIO DE THYAZOLYL BLUE TETRAZOLIUMBROMIDE (MTT)	25
3.9 AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS AUNPS NA VIABILIDADE CELULAR DE QUERATINÓCITOS HACAT PELO ENSAIO DE VERMELHO NEUTRO	26
3.10 PROLIFERAÇÃO CELULAR	27
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
4 RESULTADOS	28
4.1 EFEITO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO NO EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR APLICAÇÃO MÚLTIPLA DE TPA	28

4.2 EFEITO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS MPO E NAG.....	30
4.3 EFEITO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO NA ESPESSURA EPIDÉRMICA E NO INFILTRADO CELULAR	33
4.4 EFEITO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO NA VIABILIDADE CELULAR DOS QUERATINÓCITOS HACAT.....	37
4.5 EFEITO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO NA PROLIFERAÇÃO CELULAR DOS QUERATINÓCITOS HACAT.....	39
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1 INTRODUÇÃO

Doenças de pele são comumente tratadas de forma menos grave do que outras doenças, uma vez que não apresentam risco para a vida do paciente, de modo que seus aspectos psicossociais são ignorados (JOBILING, 1976; BHOSLE *et al.*, 2006). Dentre essas doenças, destaca-se a psoríase, uma doença inflamatória crônica de pele, caracterizada por placas bem demarcadas, elevadas, eritematosas e cobertas com escamas prateadas sobrepostas. Essas placas podem apresentar coloração acinzentada e surgimento de hiperpigmentação cutânea após a remissão das lesões (COHEN *et al.*, 2012). Por ser uma doença considerada estigmatizante, é bastante comum os pacientes apresentarem problemas como autoestima, depressão, ansiedade e outras dificuldades psicológicas, o que afeta a qualidade de vida do paciente (OTUKI *et al.*, 2011).

O tratamento medicamentoso deve ser escolhido de acordo com o tipo e a severidade do quadro. Ainda não existe um tratamento ideal descrito, devido a dificuldades com a eficácia e aparecimento de efeitos adversos (MURPHY e REICH, 2011; VILLASENOR-PARK *et al.*, 2012). O mais importante objetivo do tratamento atual é controlar o progresso da doença, reduzindo a hiperproliferação dos queratinócitos, o que causa as lesões, e assim amenizar seus efeitos nocivos sobre a qualidade de vida do paciente, melhorando parâmetros como bem-estar, ansiedade e depressão (OTUKI *et al.*, 2011).

A utilização da nanotecnologia, incluindo nanopartículas de ouro (AuNPs), terapia, vem se tornando uma alternativa promissora, devido a facilidade de síntese, tamanho controlável, biocompatibilidade, capacidade de conjugação com várias moléculas e facilidade na modificação química de sua superfície (JAIN *et al.*, 2007). Todas essas características permitem que as AuNPs possam ser utilizadas em terapias químicas, despertando interesse na investigação da sua possível ação no processo inflamatório (SUMBAYEV *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2005). Com isso, este trabalho objetiva avaliar a ação anti-inflamatória e antiproliferativa das AuNPs no modelo de edema de orelha crônico induzido por TPA e através de ensaios *in vitro* com queratinócitos da linhagem HaCat.

1.1 JUSTIFICATIVA

A psoríase é uma doença de pele que afeta 2-4% da população mundial. O tratamento pode envolver diferentes classes de medicamentos, alguns com grande potencial para efeitos colaterais e outros com elevado custo, dificultando a adesão pelo paciente (SDB, 2012). A busca por um novo agente eficaz para a terapia, com um custo/benefício acessível e com poucos ou nenhum efeito colateral seria ideal para o controle da doença e também para a melhora da qualidade de vida do paciente, visto que as lesões muitas vezes são em locais aparentes e geram desconforto e estigmatização pela sociedade. As nanopartículas têm se destacado em pesquisas científicas voltadas para a área biomédica. Existem evidências de uma possível atividade anti-inflamatória das AuNPs (SUMBAYEV *et al.*, 2013), porém não foi verificada a sua atividade anti-inflamatória em modelos de inflamação crônica de pele. Sendo assim, as AuNPs poderiam representar uma opção de terapia para doenças inflamatórias de pele, como a psoríase.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antiproliferativa e anti-inflamatória das AuNPs em modelo de inflamação cutânea em camundongos e através de ensaios *in vitro* com queratinócitos HaCat.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Testar a ação das AuNPs sobre a hiperproliferação epidermal no modelo de edema de orelha induzido por aplicação múltipla de TPA através de análise histológica.

- Verificar a ação das AuNPs sobre a celularidade através de análise histológica e da avaliação da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e n-acetil- β -D glucosaminidase (NAG).
- Observar a atividade antiproliferativa das AuNPs frente à linhagem celular HaCaT através do teste de MTT.

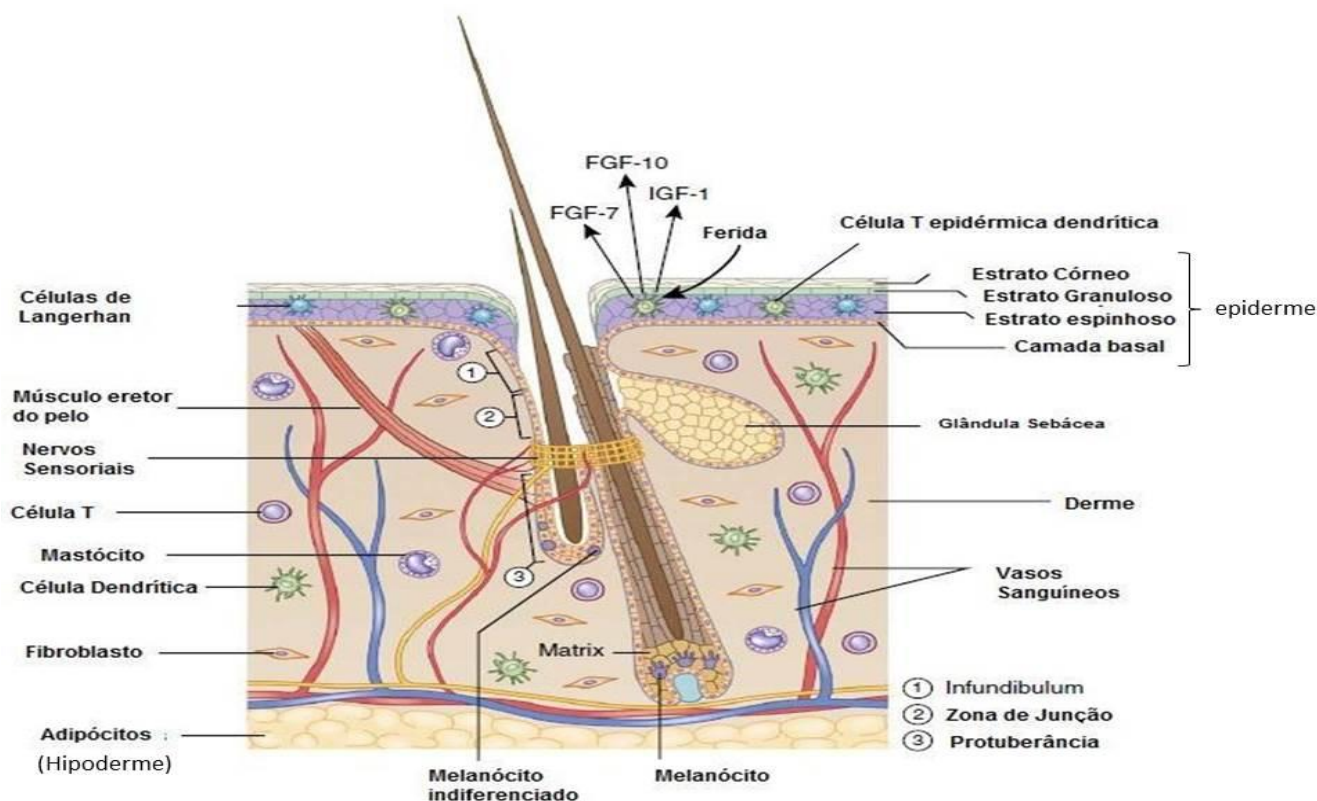
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano e desempenha a função básica de uma barreira mecânica entre o organismo e o meio ambiente, protegendo-o contra lesões, infecções e perda de água. Para isso, ela conta com a presença de diversos tipos celulares e estruturas de sustentação (ALBERTS *et al.*, 2010; DENNING, 2004).

A pele é composta por três camadas distintas: a epiderme, camada externa, a derme, camada mais espessa e intermediária, e a hipoderme, camada mais interna (FIGURA 1) (ALBERTS *et al.*, 2010).

FIGURA 1- ESTRUTURA DA PELE



FONTE: Adaptado de HSU, LI E FUCHS (2014).

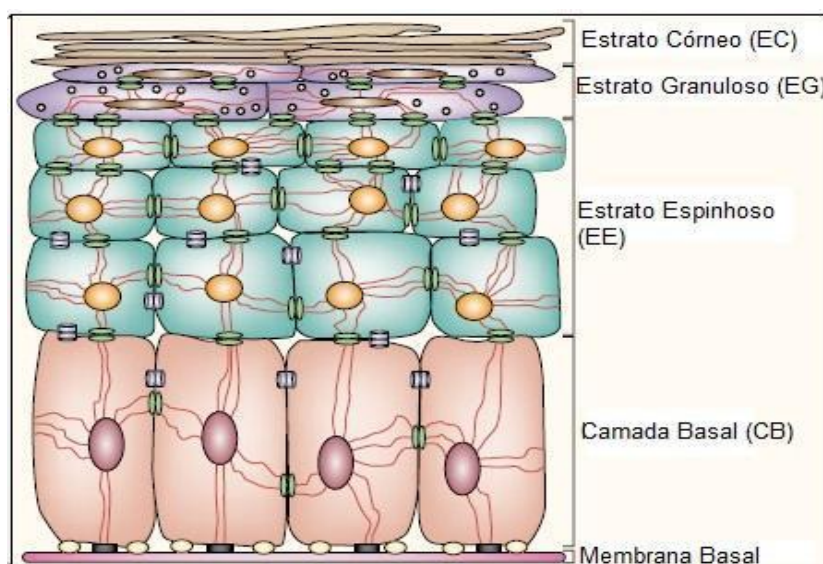
A hipoderme é a camada mais profunda da pele e consiste integralmente em tecido adiposo, atuando como uma camada protetora isolante térmica e mecânica, como um reservatório de energia, além de possuir uma função endócrina (HSU, LI e FUCHS, 2014).

A derme é composta por tecido conectivo, espesso e resistente. É responsável por fornecer suporte mecânico para a epiderme e está diretamente adjacente à epiderme (ALBERTS *et al.*, 2010; BOUWSTRA *et al.*, 2003). É rica em vasos sanguíneos e linfáticos, além de outras estruturas como folículos pilosos e glândulas sudoríparas. Apresenta células imunes residentes e transitórias, como células dendríticas, mastócitos, macrófagos e células T (PASPARAKIS, HAASE e NESTLE, 2014; HSU, LI e FUCHS, 2014). O principal tipo celular presente da derme são os fibroblastos, responsáveis pela síntese de todos os constituintes da matriz extracelular - como fibras de colágeno e elastina (ALBERTS *et al.*, 2010).

A epiderme possui entre 0,05 - 0,1 mm de espessura e é constituída por um epitélio estratificado pavimentoso. O principal tipo celular presente na epiderme são

os queratinócitos, que possuem esse nome devido a expressiva presença de filamentos de queratina em sua constituição e atuam principalmente como uma barreira contra o ambiente externo (DENNING, 2004). A epiderme pode ser dividida em quatro camadas distintas (FIGURA 2): camada basal, estrato espinhoso, estrato granuloso e estrato córneo. O estrato ou camada basal consiste em uma camada contínua de, em média, apenas uma célula, de espessura indiferenciada. A célula da camada basal é pequena e cubóide, com um grande núcleo, responsável pela proliferação celular e renovação cutânea (KOSTER e ROOP, 2004; BURNS *et al.*, 2010). Imediatamente acima, tem-se o estrato espinhoso, composto por queratinócitos epibásicos, responsáveis pela produção de filamentos de queratina. Na camada seguinte, o estrato granuloso, tem-se o processo de cornificação, em que os queratinócitos sofrem apoptose e diferenciam-se em corneócitos, devido aos agregados de queratina que são empacotados por filagrina. A camada mais externa, o estrato córneo é responsável pela proteção contra a penetração de agentes externos e contra a perda de água. Suas células, agora denominadas corneócitos, perderam o núcleo e as organelas citoplasmáticas, tornando-se achatadas. A progressão celular da camada basal até a superfície da pele dura cerca de 30 dias, porém, em doenças como a psoríase, esse processo torna-se acelerado (BURNS *et al.*, 2010; BOUWSTRA, 2003; PROKSCH, BRANDNER e JENSEN, 2008).

FIGURA 2 - CAMADAS DA EPIDERME



FONTE: Adaptado de FUCHS E RAGHAVAN (2002).

Na epiderme também estão presentes outros tipos celulares como os melanócitos, responsáveis pela pigmentação da pele, as células de Langerhans, células dendríticas apresentadoras de antígeno, que possuem um papel importante na resposta imune adaptativa da pele; e as células de Merkel, derivadas dos queratinócitos, que possuem um papel nos receptores sensoriais mecânicos em resposta ao toque (BURNS *et al.*, 2010).

2.2 PSORÍASE

A psoríase é uma doença inflamatória crônica imunomediada de pele que atinge cerca de 2 a 4% da população mundial. A prevalência varia de acordo com fatores que incluem idade, localização geográfica e etnia, provavelmente devido aos fatores genéticos e ambientais envolvidos. Ela atinge tanto homens quanto mulheres, principalmente entre as faixas etárias de 19 a 39 anos e 50 a 69 anos (PARISI *et al.*, 2013).

Quanto a etiologia genética, foram identificados 12 *loci* de susceptibilidade à doença, denominados PSORS1 a 12 e vários *loci* adicionais por análise de ligação e estudos de associação (WAGNER *et al.*, 2010). A associação com o *locus* PSORS1, que compreende uma região de 300kb no complexo principal de histocompatibilidade classe 1 (MHC-1) do cromossomo 6p21.3, foi a mais forte encontrada, sendo o alelo HLA-Cw6 encontrado em 60 - 65% dos pacientes com psoríase em um estudo no norte da Europa Setentrional (GUDJONSSON *et al.*, 2003). Porém, o desencadeamento da doença se dá através de fatores ambientais, como estresse, traumas, álcool, tabagismo, infecções e reações a drogas (WAGNER *et al.*, 2010).

A doença é caracterizada pelo surgimento de placas eritematosas, descamativas, elevadas e bem demarcadas, de coloração acinzentada. O tamanho e a distribuição das placas são variáveis e podem acometer todo o corpo. Ela pode apresentar-se clinicamente de várias formas (FIGURA 3): (a) psoríase vulgar: é considerada a mais comum, acometendo cerca de 90% dos casos, em que as regiões de trauma - cotovelos, joelhos e couro cabeludo - são os locais mais afetados; (b) psoríase gutata: apresentam-se na forma de pequenas pápulas escamosas, no tronco e raiz dos membros, principalmente em pessoas mais jovens;

(c) psoríase invertida: as lesões se localizam em regiões mais úmidas e de constante atrito, como regiões de dobra (axilas e região genital); (d) psoríase pustulosa: caracteriza-se por pústulas com base eritematosa, principalmente nas mãos e nos pés, podendo aparecer na gravidez; (e) psoríase eritrodérmica: raramente ocorre como manifestação inicial da doença e é um comprometimento do estado geral. Acomete cerca de 90% da superfície corporal, apresentando caráter crônico ou subcrônico, frequentemente associada à insuficiência cardíaca (SBD, 2012; GREB *et al.*, 2016).

Além disso, a psoríase pode estar relacionada com uma outra condição coexistente: a artrite psoriática, que se desenvolve em aproximadamente 30% dos pacientes. É uma forma de espondiloartrite que afeta de maneira crônica as articulações das mãos, pés e região sacral, levando a uma lesão deformante e incapacitante, o que reduz a qualidade de vida (RITCHILIN, COLBERT e GLADMAN, 2017).

FIGURA 3 - DIFERENTES MANIFESTAÇÕES DA PSORÍASE



FONTE: GREB *ET AL.*, 2016

O processo inflamatório ocorre após a pele sofrer uma infecção ou trauma, ativando uma resposta imune persistente que induz as células T a produzirem fatores de crescimento para promover a divisão celular dos queratinócitos (AINSWORTH, 2012). Inicialmente não há o envolvimento da epiderme, pois os leucócitos mononucleares, como células T e células dendríticas, permanecem apenas na derme, ao redor dos vasos sanguíneos. A diferenciação terminal dos queratinócitos é incompleta, uma vez que a via proliferativa está desregulada, levando a uma ativação e proliferação de células que maturaram muito rapidamente. (PEREIRA, DI MEGLIO e NESTLE, 2012).

Após uma injúria, os queratinócitos liberam o peptídeo antimicrobial (AMP) LL-37 que se liga a fragmentos de DNA próprios liberados. Esse complexo formado estimula células dendríticas plasmocitóides (pDCs), causando a sua ativação e secreção de interferon tipo I (IFN- α) e de células dendríticas mielóides (mDCs). Esse processo gera a ativação e expansão clonal de células T CD8+ na derme e nos linfonodos locais (GREB *et al.*, 2016; LOWES, SUÁREZ-FARIÑAS e KRUEGER, 2014; DI MEGLIO, VILLANOVA e NESTLE, 2014). Posteriormente, as células TCD8+ migram para a epiderme, onde encontram os receptores do MHC I na superfície de queratinócitos e melanócitos. Esse evento leva à liberação de diversas citocinas, quimiocinas e mediadores da inflamação, exacerbando a inflamação local e estimulando a proliferação dos queratinócitos. O IFN- α estimula as mDCs a secretarem mediadores pró-inflamatórios, que promovem a atividade de células Th1, Th17 e Th22, responsáveis por liberar citocinas (IFN- γ , IL-17 e IL-23, IL-22, respectivamente). A resposta das células Th17 pelas IL-23 é potencializada por IL-1, liberada pelos queratinócitos, o que estimula a produção de TNF e o recrutamento de neutrófilos. A IL-22 é responsável pelas características da doença observadas na histologia, tais como acantose (hipertrofia ou espessamento da epiderme) e paraqueratose (queratinização anormal do epitélio). Além disso, juntamente com as citocinas TNF, IFN- γ e IL-17 é responsável por induzir a proliferação dos queratinócitos e por induzir a produção de AMP, fechando um ciclo que perpetua o processo inflamatório. A expressão de fatores de crescimento vascular endotelial é responsável por induzir a proliferação vascular do endotélio e moléculas de adesão para recrutamento de neutrófilos, mastócitos e macrófagos para a pele. Dessa forma a inflamação continua a ser promovida até que ocorra remissão pelo tratamento ou remissão espontânea, mais rara (GREB *et al.*, 2016; PEREIRA, DI MEGLIO e NESTLE, 2012; LOWES, SUÁREZ-FARIÑAS e KRUEGER, 2014).

As características histológicas da doença ajudam a explicar a aparência clínica, como a acantose a partir da proliferação acelerada dos queratinócitos. Há também a presença de hiperqueratose, devido ao espessamento do estrato córneo e redução da camada granular. Ocorre paraqueratose, em razão da retenção de núcleos nas camadas superiores da pele causada pela maturação prematura dos queratinócitos, o que resulta na cornificação incompleta. E, por fim, ocorre a presença de neutrófilos acumulados na epiderme. O eritema ocorre em consequência do aumento do número de vasos sanguíneos dermais dilatados

(LOWES, SUÁREZ-FARIÑAS e KRUEGER, 2014; PEREIRA, DI MEGLIO e NESTLE, 2012).

A psoríase, assim como outras doenças de pele, frequentemente tem grande impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes, sendo altas as taxas de sentimentos como vergonha, depressão, ansiedade e idealização do suicídio, além de exclusão social. Isso se deve ao fato de que muitas das lesões são aparentes, como na face ou mãos, causando desconforto para o paciente, o que gera mais estresse e provoca uma piora nos sintomas da doença, bem como dificuldades na eficácia do tratamento (YANG e YANG, 2015).

A eficácia do tratamento, que visa controlar a doença, depende de fatores como idade do paciente, superfície corporal acometida, quantidade de tratamento tópico e a presença concomitante de outras doenças, como cardiovasculares e o alcoolismo (SBD, 2012). O tratamento tópico é indicado para pacientes com psoríase leve a moderada, podendo ser utilizado como monoterapia ou combinada a outros medicamentos tópicos ou fototerapia. Quanto a pacientes com um quadro moderado a severo, a opção mais efetiva é a fototerapia, especialmente quando a área afetada torna o tratamento tópico inviável. Porém, muitos pacientes não respondem de forma adequada aos tratamentos já citados e precisam, portanto, utilizar terapia sistêmica (GREB *et al.*, 2016).

O tratamento tópico principal consiste em corticosteróides, sendo disponíveis em várias formas e concentrações, podendo ser aplicado desde em áreas mais sensíveis como face até em áreas mais resistentes como os pés. Esse tratamento costuma ser suficiente para controlar lesões leves. Os corticosteróides possuem efeitos anti-inflamatórios, antiproliferativos, imunossupressores, vasoconstritores e antipuriginosos (SBD, 2012). Apesar de entrar em contato apenas com a área lesionada, existem efeitos sistêmicos como: atrofia da pele e outras alterações, dermatite perioral, despigmentação, supressão do eixo hipotalâmico-hipofisário, aumento da pressão arterial e diabetes (AFIFI *et al.*, 2005; SBD, 2012).

Outra opção de tratamento tópico são os análogos da vitamina D, que tem como objetivo inibir o crescimento dos queratinócitos, promover a sua diferenciação e reduzir a inflamação nas lesões psoriáticas, via receptores da vitamina D presentes nos queratinócitos e linfócitos T. Embora sejam menos efetivos, seus efeitos colaterais são mais brandos (AFIFI *et al.*, 2005; GREB *et al.*, 2016).

A fototerapia é utilizada em pacientes que apresentam um quadro mais moderado, com o objetivo de controlar a doença e reduzir a medicação. Ela atua induzindo a apoptose das células inflamatórias, aumentando a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10, suprimindo as células Th17 e ativando células Th2 e células T regulatórias (GREB *et al.*, 2016). Possui como vantagem o tratamento de toda a superfície da pele com nenhum ou o mínimo de efeitos sistêmicos e é utilizada até que ocorra remissão total ou praticamente total do quadro clínico (SBD, 2012).

Já a terapia sistêmica é indicada para pacientes com um quadro moderado a severo da doença ou que apresentem concomitantemente artrite psoriática. Seus principais representantes são o metotrexato e a ciclosporina. O metotrexato possui efeitos imunossupressores, inibindo a síntese de DNA em células imunocompetentes (GREB *et al.*, 2016). Por ser tóxico e teratogênico, é contraindicado para gestantes e para pacientes com diabetes e com problemas hepáticos. A ciclosporina é um imunossupressor que atua inibindo a atividade da enzima calcineurina fosfatase, envolvida na ativação e formação do linfócito T. Assim como o metotrexato, a ciclosporina é tóxica e possui contraindicações para pacientes com hipertensão e problemas renais (SBD, 2012).

Por último, tem-se os agentes imunobiológicos, uma nova classe de terapia que baseia-se na engenharia genética. São proteínas recombinantes, susceptíveis a digestão e administradas por via parenteral, que podem ser anticorpos monoclonais, proteínas de fusão ou citocinas humanas recombinantes. Essas novas terapias têm se mostrado eficazes em controlar doenças de pele mediadas por células T e podem limitar os efeitos adversos sistêmicos, uma vez que possuem como alvo moléculas específicas da superfície celular patogênica (CHONG e WONG, 2007). Porém, como a psoríase é uma doença que não possui cura e muitos pacientes necessitam de tratamento durante um longo período, o custo destas terapias torna-se inviável para sua utilização (SBD, 2012).

2.3 NANOPARTÍCULAS DE OURO

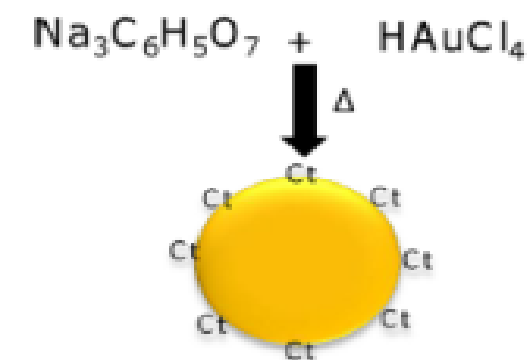
A nanotecnologia pode ser definida como a ciência e engenharia que explora as propriedades únicas de moléculas pertencentes à escala nanométrica (entre 0,1 e 100 nm de diâmetro) (SAHOO *et al.*, 2007).

Dentre os diversos tipos de nanomateriais, as AuNPs têm sido particularmente atraentes devido às suas propriedades de biocompatibilidade, tamanho e forma facilmente controláveis e modificáveis de acordo com seu agente redutor, assim como a modificação química de sua superfície (CHITHRANI, GHAZANI e CHAN, 2006).

Devido a todas estas características, as AuNPs se destacam na utilização como veículo para transporte de proteínas, biomoléculas, DNA ou fármacos, bem como para diagnóstico por imagem, fototerapias e terapias contra o câncer (SAHOO, PARVEEN e PANDA, 2007; LLEVOT e ASTRUC, 2012).

As AuNPs são sintetizadas a partir de um sal metálico (tetracloreto de ouro), chamado precursor, que sofre redução química na presença de um agente redutor (citrato de sódio), produzindo as AuNPs (PEREIRA, 2009), conforme desenhado na Figura 4.

FIGURA 4 - SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO



FONTE: ADAPTADO DE (ENGLAND ET AL., 2015)

Seu tamanho pode ser controlado por meio de vários métodos, porém a partir da redução com o citrato de sódio é possível obter tamanhos entre 12 – 20 nm. O citrato possui duas funções: atuar como agente redutor e estabilizador. Devido a essas funções, o citrato possui uma grande influência no tamanho da nanopartícula formada, pois dependendo da sua concentração, o tamanho das AuNPs pode ser maior ou menor. Com o uso de baixas concentrações de citrato, o tamanho das nanopartículas formadas é maior, ocorrendo agregação entre elas. Já com o aumento da concentração de citrato, há diminuição da aglomeração entre as AuNPs

e, conseqüentemente, diminuição do seu tamanho (HENGLEIN e GIERSSING, 1999; JANA, GEARHEART e MURPHY, 2001).

A absorção celular das AuNPs está fortemente relacionada com o seu tamanho, bem como com o tempo de exposição e sua concentração. Em relação ao tempo, as AuNPs apresentam absorção significativamente maior nas primeiras 2 horas, atingindo um platô entre 4-7 horas nos tamanhos 14, 50 e 74 nm (CHITHRANI, GHAZANI e CHAN, 2006; MIRONAVA *et al.*, 2010). Alguns estudos demonstraram que as nanopartículas de ouro entram na célula tanto por endocitose como por fagocitose – principalmente em tamanhos menores – e são internalizadas em vacúolos distribuídos uniformemente no citoplasma, sem entrar no núcleo ou na mitocôndria (OSAKI *et al.*, 2004; CHITHRANI, GHAZANI e CHAN, 2006; MIRONAVA *et al.*, 2010).

Fatores como forma e tamanho do nanomaterial podem influenciar significativamente suas propriedades bem como a absorção, função celular e toxicidade (FERNANDES *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2014). Em um estudo de WANG *et al.* (2008) foi comparada a viabilidade celular dos queratinócitos HaCaT, uma linhagem imortal transformada de células epidermais humanas, submetidas a diferentes tamanhos de AuNPs esféricas, e aos nanobastões de ouro, concluindo-se que as AuNPs não são inerentemente tóxicas a essas células humanas (WANG *et al.*, 2008).

Sabe-se que apenas moléculas de tamanhos pequenos podem atravessar o estrato córneo. Filon e colaboradores (2011) evidenciaram maior penetração de AuNPs através de pele humana danificada quando comparada com a pele intacta, provavelmente devido a presença de escoriações que colocam em contato direto nanopartículas e componentes internos da pele aumentando assim sua interação e a quantidade de ouro que permanece na pele. Este conhecimento é importante, uma vez que doenças como psoríase podem tornar a pele mais permeável devido ao dano cutâneo (SARACENO *et al.*, 2011).

As AuNPs reduziram a proliferação, adesão e a migração celular de linhagens como fibroblastos e múltiplos mielomas, sendo que esses efeitos foram mais exacerbados com o aumento da concentração de AuNPs (PERNODET *et al.*, 2006; MIRONAVA *et al.*, 2010; BHATTACHARYA *et al.*, 2007). Estudos evidenciaram possíveis efeitos anti-inflamatórios em ratos com artrite induzida, com a observação de redução do infiltrado leucocitário e dos níveis de citocinas pró-

inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β após tratamento com AuNPs de 13 nm intra-articular (TSAI *et al.*, 2007).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

As AuNPs foram sintetizadas no laboratório de Síntese e Complexos Multifuncionais da Universidade do Extremo Sul Catarinense/UNESC, em Criciúma/SC. AuNPs de tamanho médio de 10 nm foram sintetizadas como descrito por Turkevich *et al.* (1951) com pequenas modificações. O processo de síntese foi realizado a partir de redução química do precursor metálico ácido tetracloroáurico (HAuCl₄) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) com o agente redutor e estabilizante citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇·2H₂O) (Nuclear, SP, Brasil). O controle da dimensão das nanopartículas foi realizado variando-se a concentração de citrato de sódio. Inicialmente, 100 mL de 0,50 mM de ácido tetracloroáurico foram transferidos para um balão de fundo redondo e a solução foi aquecida até 90 °C, sob agitação constante a 700 rpm. A solução de citrato de sódio, previamente preparada, foi então adicionada, e o sistema foi mantido à temperatura descrita, agitando-se a 200 rpm durante 20 minutos. A solução adquiriu a coloração correspondente ao tamanho das AuNPs sintetizadas, de acordo com o que está descrito na literatura (PEREIRA, 2009; ALKILANY e MURPHY, 2010; PHILIP, 2008). As dispersões de AuNPs apresentaram pH 5,8 ao final do processo de síntese. Então, o pH foi ajustado ao pH fisiológico com solução tampão e, posteriormente, as AuNPs foram centrifugadas (13.000 rpm por 15 min) e lavadas duas vezes com água ultrapura para posteriormente serem obtidas as dispersões coloidais nas concentrações de trabalho, o que foi feito a partir de diluições em água destilada estéril. Após a síntese das nanopartículas, amostras foram encaminhadas para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) para a verificação do seu diâmetro e formato e confirmação do seu formato esférico e do seu diâmetro médio de 10 nm, como proposto pelo método de síntese. Além disso, as AuNPs foram caracterizadas por espectroscopia de

absorção no ultravioleta-vísivel (UV-Visível), difratometria de raios-X, potencial zeta, espectrofotometria de absorção atômica e microscopia eletrônica de varredura por canhão de emissão de campo elétrico (FEG).

3.2 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos Swiss fêmeas (25-35 g) provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, mantidos em temperatura de 22 ± 2 °C, em ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso à água e ração. Os animais foram mantidos na sala de experimentos para adaptação por um período de pelo menos 24 horas antes do início dos experimentos e usados somente uma vez em cada teste. Os experimentos foram realizados de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratórios e todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Paraná, sob o número 1045. Para os experimentos, os animais foram divididos randomizadamente em 11 grupos: naive, controle TPA, tratamento tópico com AuNPs 0,1% em creme, tratamento tópico com citrato de sódio 0,008% em creme (correspondendo ao veículo das AuNPs 0,1%), tratamento tópico com AuNPs 0,3% em creme, tratamento tópico com citrato de sódio 0,024% em creme (correspondendo ao veículo das AuNPs 0,3%), tratamento com dexametasona 0,1% (controle positivo), tratamento com creme (veículo), tratamento intraperitoneal (IP) com AuNPs 3 mg/Kg, tratamento intraperitoneal com citrato 12 mg/ml e tratamento intraperitoneal com salina (veículo).

3.3 EDEMA DE ORELHA

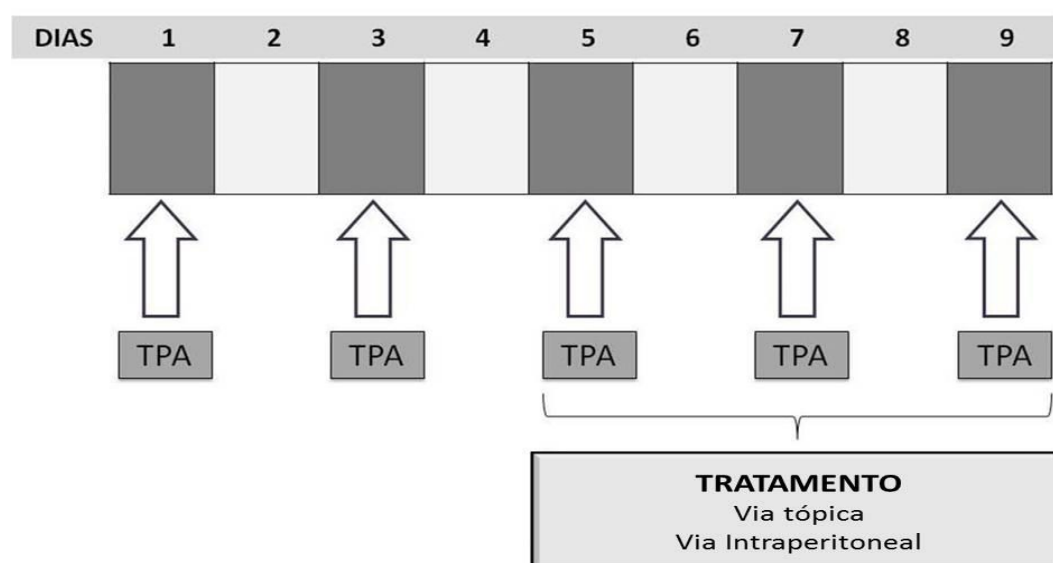
O edema é expresso como o aumento da espessura (μm) da orelha dos camundongos. A espessura foi medida próxima à porção medial da orelha e registrada com o auxílio de um micrômetro digital (Eletronic Outsids Micrometer 0-25mm 0.001mm, Digimess). O edema foi avaliado pela diferença entre a medida basal e a medida após determinado tempo da indução do processo inflamatório.

3.4 INFLAMAÇÃO CUTÂNEA INDUZIDA PELA APLICAÇÃO MÚLTIPLA DE TPA - MODELO DE INFLAMAÇÃO CRÔNICA

Esse modelo de inflamação crônica permite avaliar a ação anti-inflamatória do fármaco frente a um processo inflamatório já estabelecido. No modelo crônico, a concentração de TPA dissolvida em acetona foi na proporção de 2,0 µg/20 µL. Este volume de 20 µL contendo TPA foi aplicado na orelha direita dos camundongos.

O processo inflamatório crônico foi induzido pela múltipla aplicação de TPA (2,0 µg/orelha) em dias alternados, durante 9 dias, conforme (FIGURA 5). Os cremes com AuNP e dexametasona (controle positivo) foram administradas a partir do quinto dia de experimento pela via tópica (cerca de 20 mg/orelha), durante 4 dias consecutivos (2 vezes ao dia – 12/12h), e o edema foi avaliado diariamente (STANLEY *et al.*, 1991). No 9º dia do experimento os animais foram eutanasiados e biópsias (círculos de 6 mm) do tecido das orelhas foram coletadas e armazenadas a –80°C para serem submetidas às análises posteriores. Para a análise histológica, as amostras foram imediatamente colocadas em solução ALFAC.

FIGURA 5: DESENHO EXPERIMENTAL DO MODELO DE INFLAMAÇÃO CRÔNICA INDUZIDO POR TPA



FONTE: O AUTOR (2017)

O TPA (20 µl/orelha) foi aplicado por via tópica uma vez ao dia, em dias alternados, durante 9 dias. Os tratamentos com AuNPs (0,1% e 0,3%), citrato de sódio (0,008% e 0,024%) ou dexametasona (fármaco de referência, 0,1%) foram administrados por via tópica a partir do quinto dia a cada 12 horas (2x ao dia) e por via intraperitoneal 1x ao dia.

3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MIELOPEROXIDASE (MPO) E DA N-ACETIL-B-D GLUCOSAMINIDASE (NAG)

A determinação da atividade das enzimas MPO e NAG foi realizada conforme descrito por De Young et al. (1989). As amostras de tecido (biópsias da orelha, 6 mm) foram homogeneizadas em 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 80 mM pH 5,4 contendo 0,5% de HTAB durante 45 s a 0°C. O homogenato foi centrifugado a 11200 x g a 4°C por 20 min. Para avaliação da MPO, utilizada como indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares, triplicatas de 30 µL do sobrenadante foram transferidas para placas de 96 poços, onde posteriormente foram adicionados 200 µL de uma mistura contendo 100 µL de tampão fosfato de sódio 80 mM pH 5.4, 85 µL de tampão fosfato de sódio (PBS) 0,22M pH 5.4 e 15 µL de peróxido de hidrogênio 0,017%. A reação foi iniciada com a adição de 20 µL de TMB 18,4 mM dissolvidos em uma solução aquosa de dimetilformamida a 8%. A placa foi então incubada a 37°C por 3 minutos, e a reação interrompida pela adição de 30 µL de acetato de sódio 1,46 M pH 3.0 em cada poço. A atividade da NAG, utilizada como indicativo da presença de leucócitos mononucleares, foi verificada transferindo-se 25 µL do sobrenadante para cada poço de uma placa de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 100 µL de tampão citrato 50 mM pH 4,5. A reação foi iniciada com a adição de 25 µL de p- nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosamina 2,24 mM. A placa foi então incubada a 37 °C durante uma hora e a reação foi interrompida pela adição de 30 µL de tampão glicina 200 nM pH 10,4. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL808) com comprimento de onda de 620 ou 405 nm, para MPO ou NAG, respectivamente, sendo expressa como mDO/biópsia.

3.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As amostras do tecido de orelhas coletadas dos camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de TPA foram fixadas em solução ALFAC (85 mL de álcool 80%, 10 mL de formol 40% e 5 mL de

ácido acético glacial) num período de 16 horas, sendo em seguida conservadas em álcool 70% até início do processo de desidratação. As orelhas foram posteriormente desidratadas, emblocadas em parafina, seccionadas em cortes de 5 μm em um micrótomo e coradas com hematoxilina e eosina. As lâminas foram fotografadas no Microscópio Olympus BX51, e a infiltração de leucócitos, edema e espessura da epiderme foram avaliadas em áreas representativas com aumento de 200x e/ou 400x. A quantificação dos leucócitos presentes na derme foi realizada através da contagem dessas células por campo com aumento de 400x, sendo analisados 5 campos de 3 cortes histológicos distintos de três animais por grupo.

3.7 CULTIVO DE QUERATINÓCITOS HACAT

Os queratinócitos HaCaT provenientes do banco de células do Rio de Janeiro foram cultivados em Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) em garrafas de cultura mantidas em ambiente umidificado a 37°C e 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias. Todas as espécies celulares apresentavam tempo de dobramento de 2 dias. Após a monocamada celular atingir confluência, as células foram lavadas com solução de PBS estéril. Para o tipo celular HaCaT foi adicionado 6 mL do quelante EDTA por 10 minutos antes da etapa descrita anteriormente. Após as células desaderirem do fundo da garrafa, foi adicionado igual volume de DMEM a 10% de SFB. As células foram então homogeneizadas em DMEM a 10% de SFB e a suspensão celular foi transferida para outras garrafas. Ao início de cada experimento foi realizada a contagem das células em câmara de Neubauer para determinação da proporção de células por poço. Para o procedimento de contagem, após as células desaderirem da garrafa, a suspensão celular foi centrifugada, o sobrenadante descartado e o pellet celular ressuspensionado em 1mL de DMEM a 1% de SFB. Uma alíquota de 10 μL da suspensão celular foi acrescida em 10 μL de solução de azul de tripan e realizada contagem em câmara de Neubauer. Em seguida, o número de células foi multiplicado pelo fator de diluição (2) e por 10^4 , para quantificação do número de células presentes na suspensão de 1 mL.

3.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS AUNPS NA VIABILIDADE CELULAR DE QUERATINÓCITOS HACAT PELO ENSAIO DE THYAZOLYL BLUE TETRAZOLIUMBROMIDE (MTT)

Foi avaliado o efeito das dispersões de AuNPs de 10 nm de diâmetro nas seguintes concentrações: 30, 10, 3 e 1 mg/mL, no período de 24 horas na viabilidade celular de queratinócitos HaCaT, através do ensaio do Thiazolyl blue tetrazoliumbromide (MTT). O MTT é indicado para determinação do número de células vivas com atividade mitocondrial intacta através de espectrofotometria, podendo ser utilizado como medida de viabilidade celular. Trata-se de um método colorimétrico que verifica a atividade da enzima desidrogenase mitocondrial em reduzir o corante 3[4,5-dimetiltiazol- 2-il]- 2,5-brometodifeniltetrazolium (MTT) produzindo cristais de formazan insolúveis em água, passando da coloração amarela para púrpura. Ao adicionar o agente solubilizante dos cristais ocorre a ruptura das membranas celulares liberando o formazan (corante) para análise espectrofotométrica a 570 nm (MOSMANN, 1983).

Os queratinócitos HaCaT foram plaqueados na proporção de 7×10^3 células/poço em placas de 96 poços com DMEM a 10% de SFB. Após incubação das placas por 24h em incubadora a 5% de CO₂ e 37°C o meio foi removido e foi adicionado DMEM a 1% SFB com as dispersões de AuNPs nas concentrações de 30, 10, 3 e 1 mg/L e com as dispersões de citrato, equivalentes às concentrações do veículo, nas mesmas concentrações, sendo cada concentração adicionada em triplicata. Poços que receberam apenas DMEM a 1% SFB, sem tratamento, foram utilizados como controle. Os testes de citotoxicidade foram realizados após 24 horas de tratamento das células com as dispersões das AuNPs e citrato. Após a incubação das células com o tratamento pelo período determinado o sobrenadante dos poços foi removido e foi aplicado 200 µL de solução de MTT a 0,5 mg/mL. As placas foram mantidas por 3h em incubadora de CO₂. Em seguida, o conteúdo da placa foi descartado e adicionado 200 µL de etanol em cada poço. Por fim, foi feita leitura da absorbância dos poços da placa por espectrofotometria em leitor de microplaca a 570 nm. Os experimentos foram realizados ao menos 3 vezes com 3 passagens distintas.

Após a obtenção dos valores de absorbância, foi calculada a viabilidade celular dos queratinócitos que receberam os diferentes tratamentos. Esses valores

foram comparados aos do controle. Os poços que receberam apenas DMEM a 1% SFB foram considerados como poços com 100% de viabilidade celular.

3.9 AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS AUNPS NA VIABILIDADE CELULAR DE QUERATINÓCITOS HACAT PELO ENSAIO DE VERMELHO NEUTRO

Foi avaliado também o efeito das dispersões de AuNPS de 10 nm de diâmetro nas seguintes concentrações: 30, 10, 3 e 1 mg/mL, no período de 24 horas na viabilidade celular de queratinócitos HaCaT, através do ensaio do Vermelho Neutro (VN). O ensaio de incorporação de vermelho neutro é uma estimativa quantitativa do número de células viáveis em cultura, sendo um dos testes de citotoxicidade mais utilizados. O teste é fundamentado na capacidade de células viáveis incorporarem e se ligarem ao corante, que penetra as membranas celulares por difusão passiva não-iônica, concentrando-se nos lisossomos (REPETTO, DEL PESO e ZURITA, 2008).

Os queratinócitos HaCat foram plaqueados e tratados da mesma maneira que no ensaio de MTT. Após a incubação das células com o tratamento pelo período determinado, o sobrenadante foi descartado e foi pipetado 200µL de solução de Vermelho neutro a 0,5% em DMEM 1% SFB, previamente centrifugada e mantida por 30 minutos a 37 °C. As células foram incubadas com o corante por 3 horas. Após o tempo de ação do corante, fora do fluxo laminar, o sobrenadante foi descartado, os poços foram lavados com solução de formaldeído e CaCl e foi pipetado 200 µL de solução de ácido acético e etanol. As placas foram levadas ao agitador de placas por 10 minutos até a completa dissolução do corante e então realizada leitura de absorbância em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 540 nm. Os experimentos foram realizados ao menos 3 vezes. Após obter os valores de absorbância, foi calculada a viabilidade celular dos queratinócitos que receberam os diferentes tratamentos. Esses valores foram comparados com os do controle. Os poços que recebem apenas DMEM 1% SFB foram considerados como poços com 100% de viabilidade celular.

3.10 PROLIFERAÇÃO CELULAR

Para avaliar a proliferação celular dos queratinócitos HaCat, as células foram cultivadas à $3,5 \times 10^3$ células/poço com meio DMEM 10% SFB. Após 16 horas do plaqueamento, com as células aderidas e estabilizadas na placa de cultura, o meio foi retirado e substituído por DMEM 0% SFB, sendo que este era mantido por 6 horas antes do tratamento. Esse período de carência é importante para que todas as células entrem na mesma fase do ciclo celular (G0). Após esta etapa, as células tratadas com meio 0,05% têm proliferação basal e células tratadas com meio 10% de SFB apresentam aumento significativo da proliferação, uma vez que o SFB é sabidamente um estimulador da proliferação celular. As células foram incubadas com diferentes concentrações de AuNPs e citrato, diluídas em meio 10% SFB por 72 horas e, em seguida foram procedidos os ensaios para avaliação da inibição da proliferação celular pelo MTT. Já para avaliar o aumento da proliferação celular, as células foram incubadas com as mesmas concentrações de AuNPs e citrato de sódio, diluídas em meio 0,05% SFB, também por 72 horas.

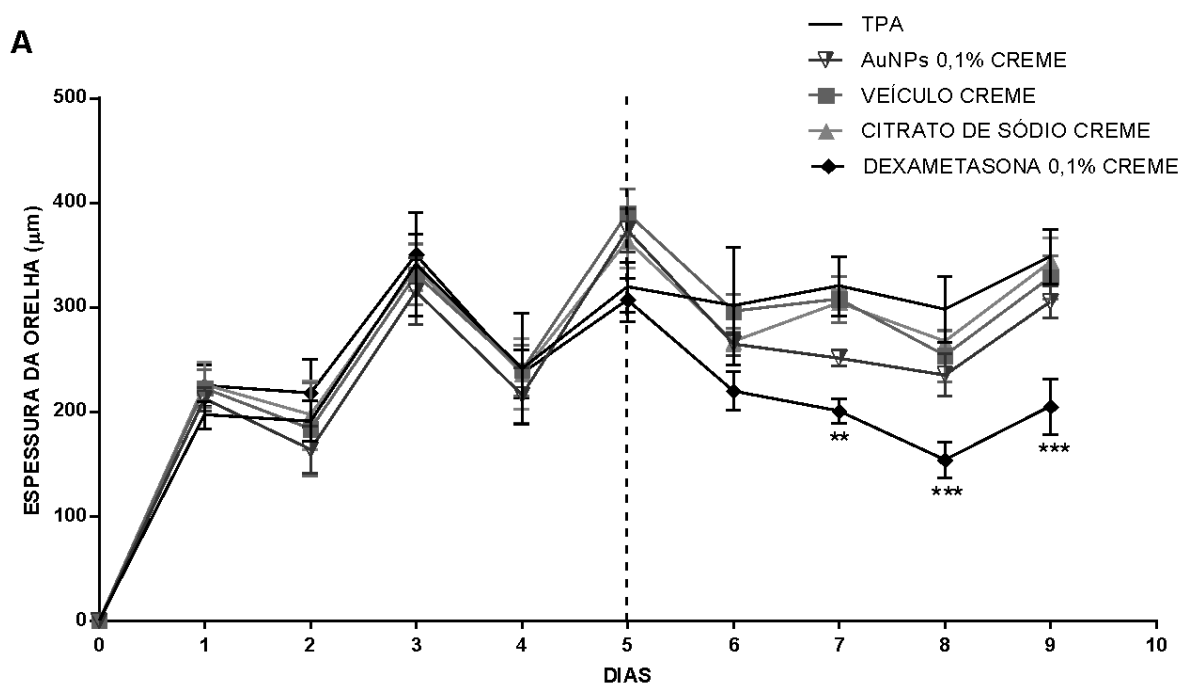
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média \pm E.P.M. A significância estatística entre os grupos foi avaliada por análise de variância de uma via (ANOVA) (seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls) e de duas vias (seguida do teste post-hoc de Bonferroni). O nível de significância aceito para os testes foi de $P < 0,05$. Todos os testes foram realizados utilizando o software estatístico GraphPad Prism 6.0 (San Diego, Califórnia, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO NO EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR APLICAÇÃO MÚLTIPLA DE TPA

O edema de orelha induzido após aplicações múltiplas de TPA é um modelo que representa um processo inflamatório crônico caracterizado por edema, hiperproliferação da epiderme e infiltrado celular de leucócitos. Conforme é possível observar no Gráfico 1, o TPA promoveu o edema, que foi calculado diariamente a partir da diferença da espessura basal da orelha para avaliar se houve alteração do processo inflamatório estabelecido devido aos tratamentos. Os tratamentos com as AuNPs 0,1% e 0,3% em creme e na dose de 3 mg/Kg via intraperitoneal não foram capazes de reduzir significativamente o edema quando comparados ao grupo veículo, assim como os tratamentos com citrato de sódio (0,008% e 0,024% em creme 0,1% e 0,3%, respectivamente e 1,2% via IP). Apenas o grupo do controle positivo (dexametasona 0,1%) obteve resposta em relação ao edema, reduzindo-o conforme esperado, com inibições máximas de $39,3 \% \pm 13,8\%$ (GRÁFICO 1A) e $79,6 \pm 13,8\%$ (GRÁFICO 1B) quando comparado ao veículo.



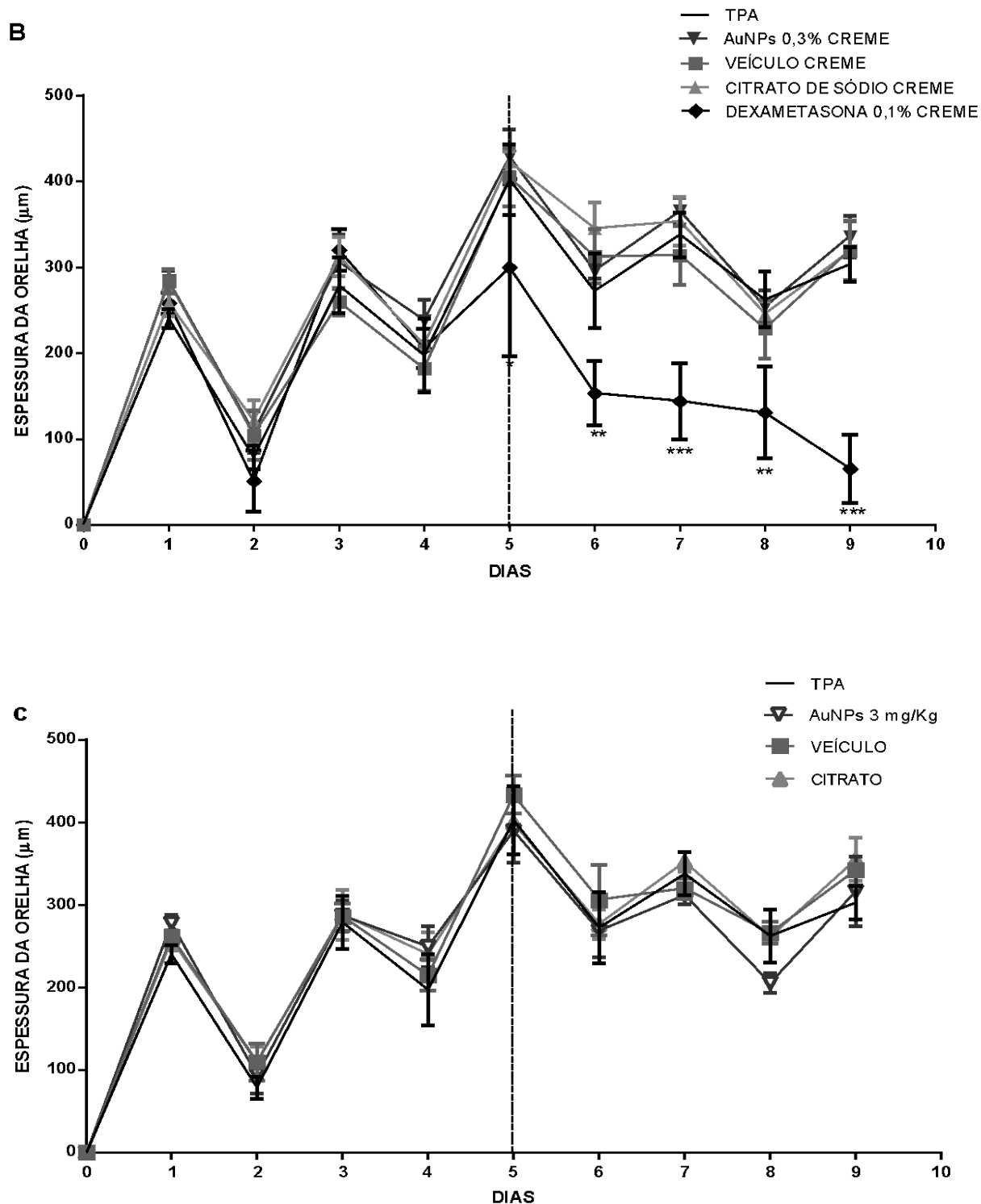


Gráfico 1- Efeito das AuNPs no edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de TPA. O processo inflamatório crônico foi induzido pela aplicação tópica de TPA (2,0 μg /orelha) em dias alternados, durante 9 dias. As AuNPs foram administradas por via tópica na dose de 0,1% creme (A) e 0,3% creme (B) e por via intraperitoneal 3 mg/Kg (C), a partir do quinto dia do início da aplicação do TPA, durante 4 dias, duas vezes ao dia. A espessura da orelha foi verificada diariamente e os valores foram expressos como média \pm E.P.M. (n=6). ***P < 0,001 representa o nível de significância em relação ao veículo.

4.2 EFEITO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO NA ATIVIDADE DAS ENZIMAS MPO E NAG

Após a eutanásia dos animais, as amostras de orelhas foram coletadas para análise da atividade das enzimas mieloperoxidase e N-acetil-B-D glucosaminidase. Estas enzimas estão presentes nos grânulos dos leucócitos polimorfonucleares e mononucleares, respectivamente, e são liberadas após lise celular ou apoptose (ODOBASIC, KITCHING e HOLDSWORTH, 2016), sendo indicadoras do processo de quimiotaxia de leucócitos e utilizada como marcador da presença destas células no exsudato inflamatório. Nos gráficos 2, 3 e 4 (AuNPs 0,1% creme, AuNPs 0,3% creme e AuNPs 3 mg/Kg IP, respectivamente) é possível verificar que não houve alteração na atividade das enzimas MPO e NAG em nenhum dos tratamentos realizados com AuNPs quando comparados com o grupo veículo creme, indicando que não houve redução tanto da migração celular de neutrófilos quanto de monócitos para o tecido inflamado.

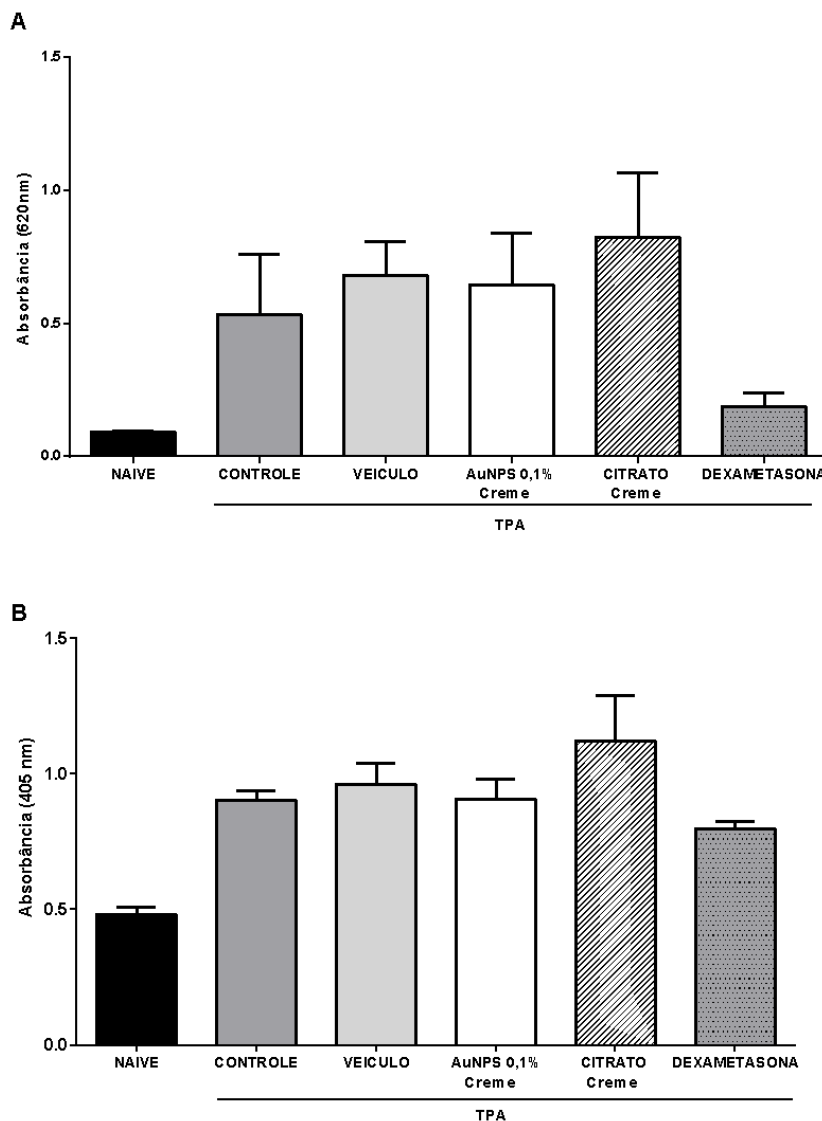


Gráfico 2 - Efeito das AuNPs 0,1% em creme administrado por via tópica, na atividade das enzimas MPO (A) e NAG (B) induzida pela aplicação múltipla de TPA. O processo inflamatório crônico foi induzido pela aplicação tópica de TPA (2,0 µg/orelha) em dias alternados, durante 9 dias. As AuNPs (0,1%), o citrato de sódio (0,008%) e a dexametasona (0,1%) foram administrados via tópica durante 4 dias, duas vezes ao dia, após o quinto dia do início da aplicação do TPA. Os valores foram expressos como média ± E.P.M. (n=3) ***P< 0,001 representa o nível de significância em relação ao veículo.

Entretanto, no gráfico 3, que representa o efeito do tratamento com AuNPs 0,3% em creme, houve um aumento significativo na atividade da enzima MPO no grupo que recebeu tratamento com citrato de sódio. Essa alteração significativa na atividade da MPO demonstra que há um possível aumento da migração celular de neutrófilos para o tecido na presença do citrato de sódio na concentração de 0,024% em creme (GRÁFICO 3A).

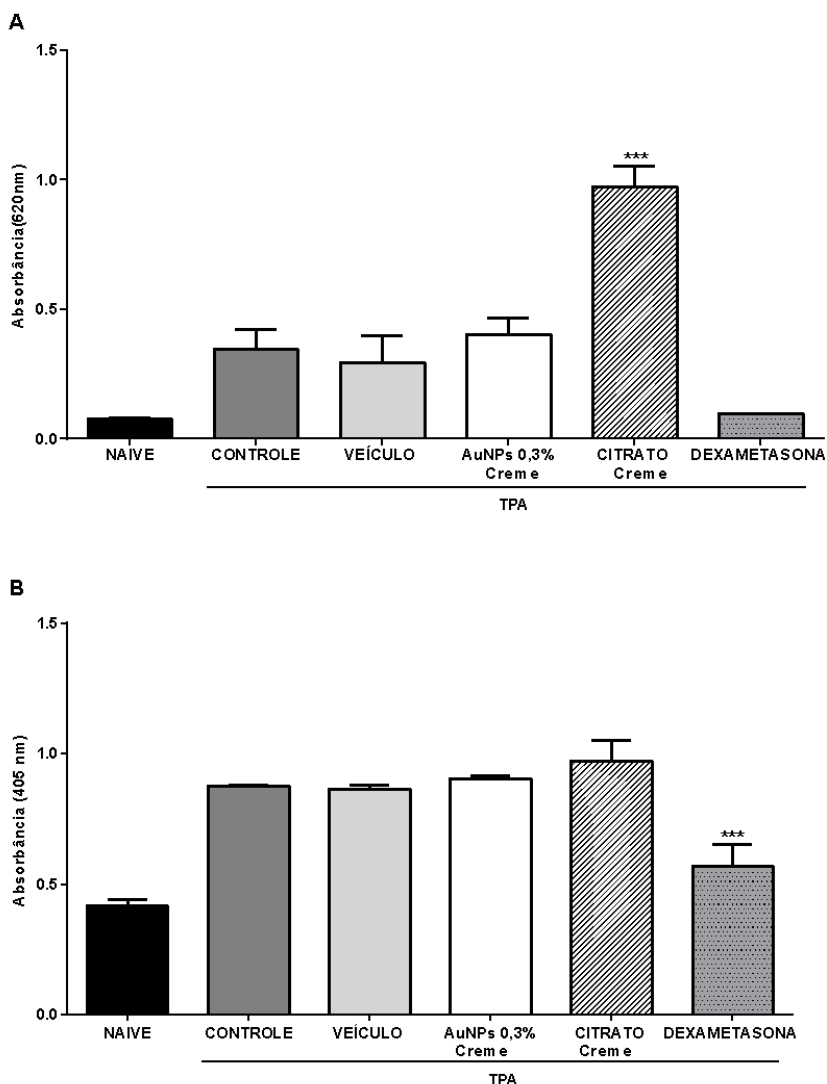


Gráfico 3 - Efeito das AuNPs 0,3% em creme administrado por via tópica, na atividade das enzimas MPO (A) e NAG (B) induzida pela aplicação múltipla de TPA. O processo inflamatório crônico foi induzido pela aplicação tópica de TPA (2,0 µg/orelha) em dias alternados, durante 9 dias. As AuNPs (0,3%), o citrato de sódio (0,024%) e a dexametasona (0,1%) foram administrados via tópica durante 4 dias, duas vezes ao dia, após o quinto dia do início da aplicação do TPA. Os valores foram expressos como média \pm E.P.M. (n=3). ***P< 0,001 representa o nível de significância em relação ao veículo.

Com relação à dose testada via intraperitoneal (GRÁFICO 4), houve um aumento da atividade da enzima MPO no grupo veículo, ou seja, no grupo que recebeu apenas salina, enquanto que nos outros grupos não houve alteração significativa. Para a melhor elucidação dos dados obtidos, foi realizada a análise histológica das amostras.

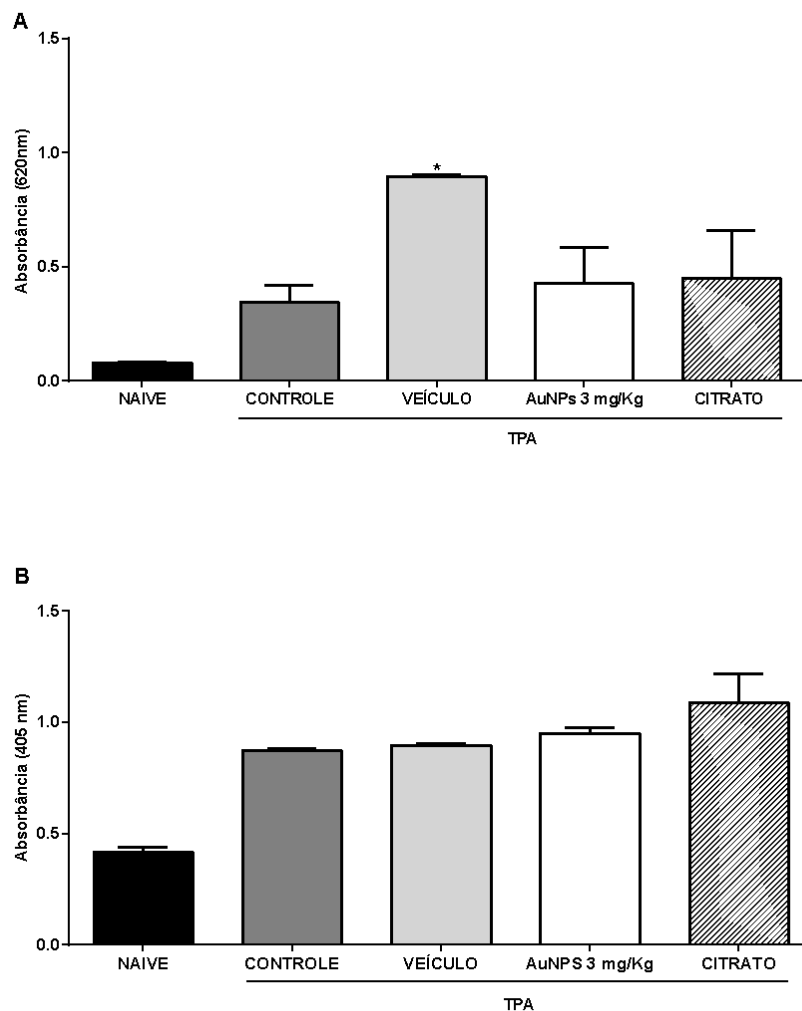


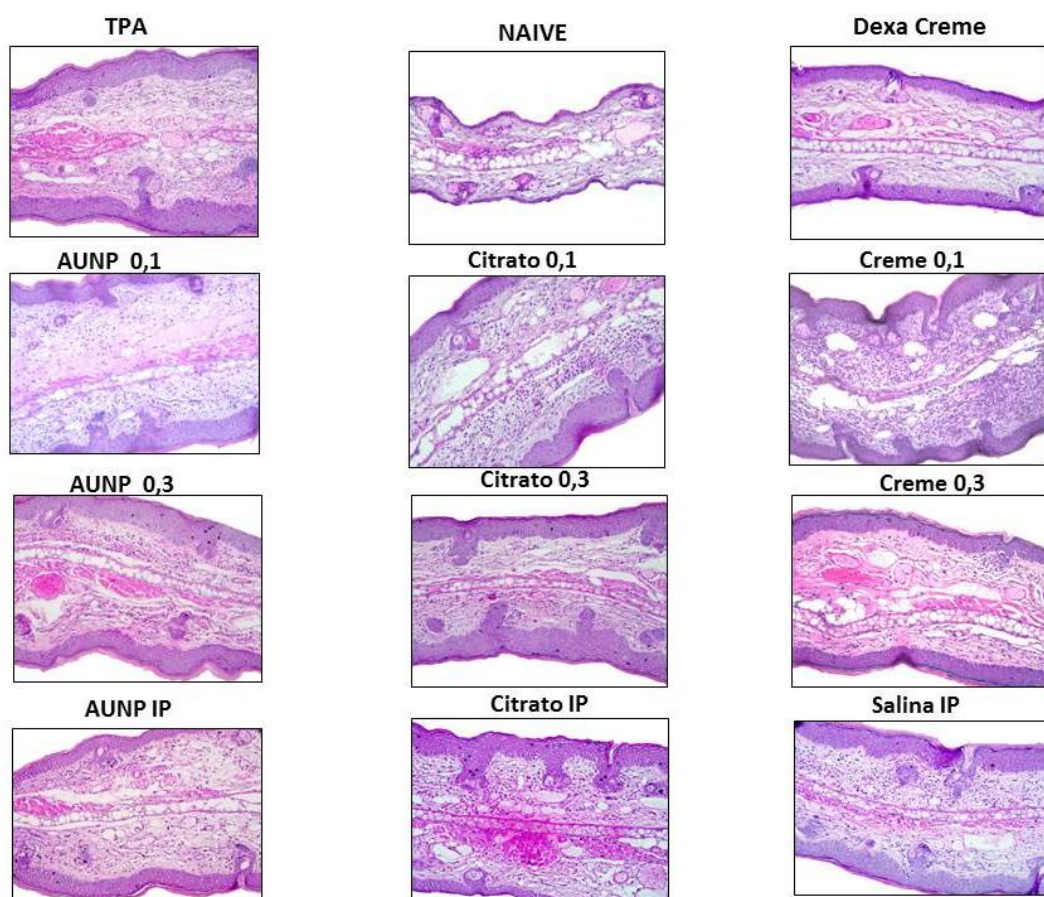
Gráfico 4 - Efeito das AuNPs administradas por via intraperitoneal na atividade das enzimas MPO (A) e NAG (B) induzida pela aplicação múltipla de TPA. O processo inflamatório crônico foi induzido pela aplicação tópica de TPA (2,0 µg/orelha) em dias alternados, durante 9 dias. As AuNPs (3 mg/Kg) e o citrato de sódio (1,2%) foram administrados via intraperitoneal durante 4 dias, duas vezes ao dia, após o quinto dia do início da aplicação do TPA. Os valores foram expressos como média ± E.P.M. (n=3). ***P< 0,001 representa o nível de significância em relação ao veículo.

4.3 EFEITO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO NA ESPESSURA EPIDÉRMICA E NO INFILTRADO CELULAR

A análise histológica das amostras avaliou a espessura epidérmica e a infiltração de células inflamatórias para a epiderme (FIGURA 6). Foi possível verificar que após a indução do processo inflamatório com TPA, tanto o tratamento com AuNPs 0,1% em creme como os demais grupos não alteraram a espessura

epidérmica e o infiltrado celular epidérmico quando comparado ao veículo creme (GRÁFICO 5).

FIGURA 6 - CORTES HISTOLÓGICOS DE ORELHAS DE CAMUNDONGOS



FONTE: O AUTOR (2017)

Fotos representativas de cortes histológicos de orelhas de camundongos corados com HE após aplicação repetida de TPA. (200x)

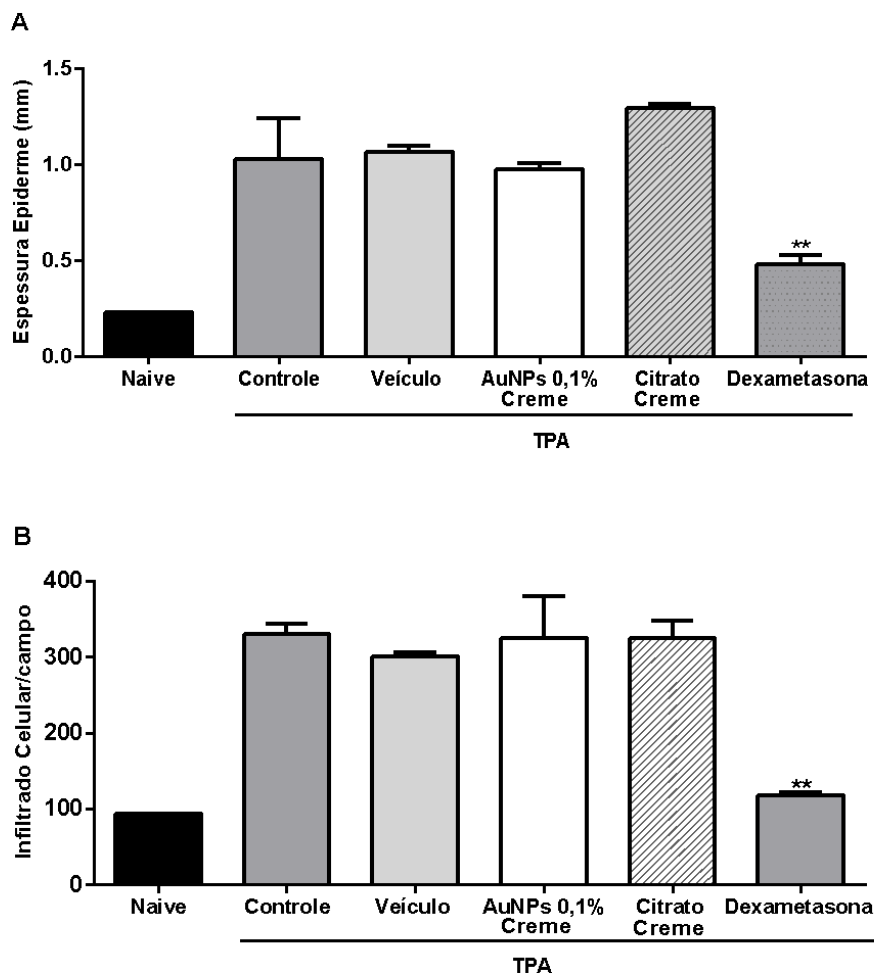


Gráfico 5 - Efeito das AuNPs 0,1% creme, administrada por via t3pica, na espessura da epiderme (A) e na migraç3o leucocit3ria (B) induzida pela aplicaç3o m3ltipla de TPA na orelha dos camundongos. A quantificaç3o foi realizada atrav3s da contagem dos leuc3citos totais com aumento de 200x em cinco campos distintos de tr3s cortes histol3gicos de grupos distintos. As barras verticais representam a m3dia \pm E.P.M. (n=3). ***P < 0,001 representa o n3vel de signific3ncia em relaç3o ao ve3culo.

J3 o tratamento com AuNPs 0,3% em creme promoveu um aumento da espessura epid3rmica em $15,3\% \pm 3,5\%$ e um aumento do infiltrado celular epid3rmico em $16,4\% \pm 4,4\%$ quando comparado ao ve3culo creme (GR3FICO 6). Da mesma forma, o tratamento com citrato de s3dio 0,024% em creme foi capaz de aumentar a espessura da epiderme e o infiltrado celular em $41,3\% \pm 3,5\%$ e $24,8\% \pm 4,4\%$, respectivamente, conforme demonstrado no gr3fico 6.

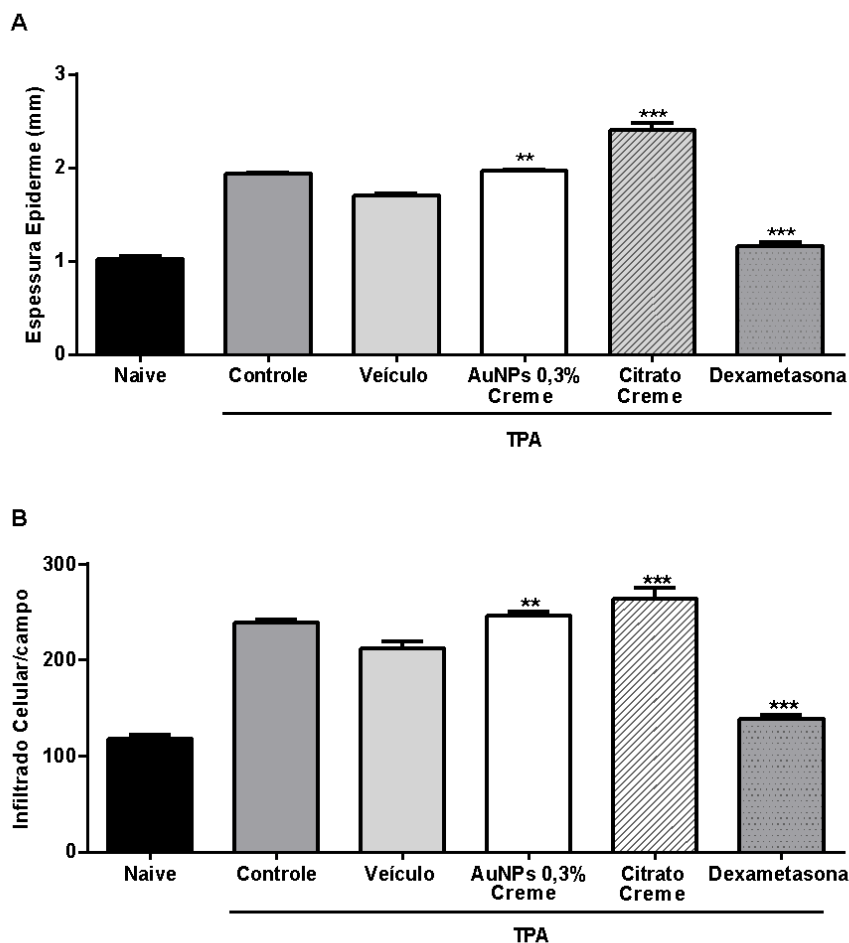


Gráfico 6 - Efeito das AuNPs 0,3% creme, administrada por via tópica, na espessura da epiderme (A) e na migração leucocitária (B) induzida pela aplicação múltipla de TPA na orelha dos camundongos. A quantificação foi realizada através da contagem dos leucócitos totais com aumento de 200x em cinco campos distintos de três cortes histológicos de grupos distintos. As barras verticais representam a média \pm E.P.M. (n=3). ***P < 0,001 representa o nível de significância em relação ao veículo

O tratamento com AuNPs 3 mg/Kg, via intraperitoneal, promoveu redução da espessura epidérmica em $15,3\% \pm 3,5\%$ quando comparado ao veículo (GRÁFICO 7). Não houve alteração do infiltrado celular epidérmico. O tratamento com citrato de sódio 1,2% não promoveu alteração em nenhum dos parâmetros analisados.

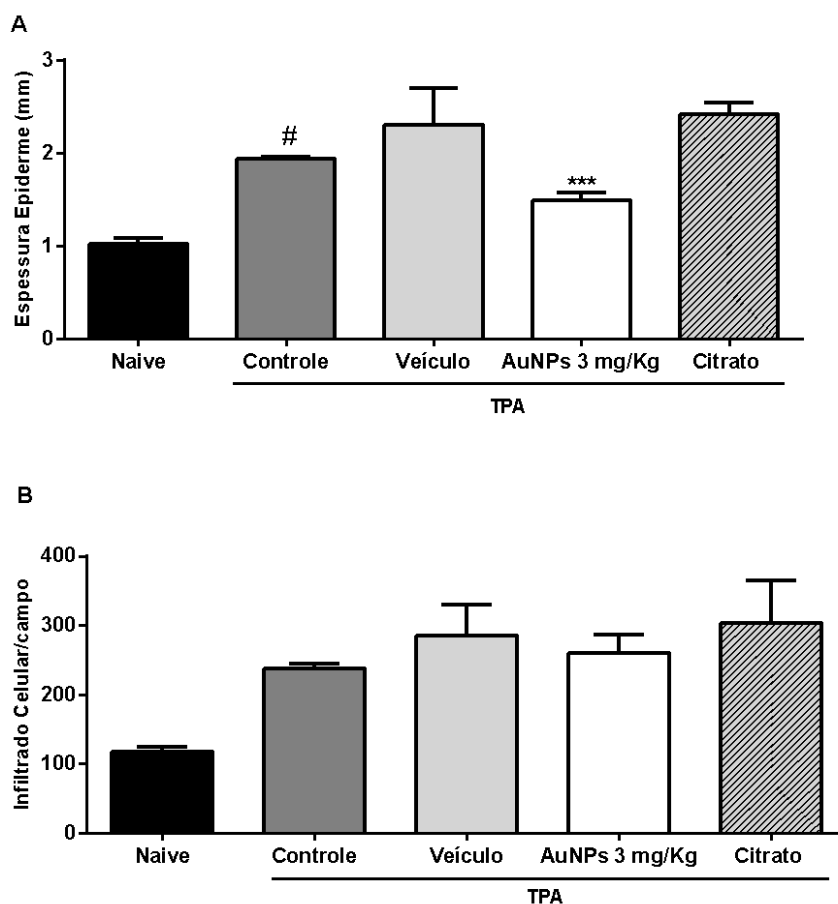


Gráfico 7 - Efeito das AuNPs 3 mg/Kg administradas por via intraperitoneal, na espessura da epiderme (A) e na migração leucocitária (B) induzida pela aplicação múltipla de TPA na orelha dos camundongos. A quantificação foi realizada através da contagem dos leucócitos totais com aumento de 200x em cinco campos distintos de três cortes histológicos de grupos distintos. As barras verticais representam a média \pm E.P.M. (n=3). ***P < 0,001 representa o nível de significância em relação ao veículo.

4.4 EFEITO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO NA VIABILIDADE CELULAR DOS QUERATINÓCITOS HACAT

Foi analisado o potencial de citotoxicidade das AuNPs com diâmetro de 10 nm nas concentrações de 1, 3, 10 e 30 mg/mL por 24 h em queratinócitos HaCaT e dos seus respectivos veículos, através do ensaio de MTT e do Vermelho Neutro. O teste de viabilidade pela metodologia do MTT indicou que a concentração de 30 mg/mL das dispersões de AuNPs e citrato de sódio causaram redução em 43,25% na viabilidade dos queratinócitos após 24 h (GRÁFICO 8A), sendo que as demais concentrações não causaram alterações significativas.

Para confirmar os resultados do ensaio de MTT, foi realizado o ensaio de Vermelho Neutro, que indicou uma redução na viabilidade celular dos queratinócitos em contato com as dispersões de AuNPs e citrato de sódio nas concentrações de 10 e 30 mg/mL, reduzindo em 70% e 52%, respectivamente. Já o citrato de sódio reduziu em 44% e 58%, nas concentrações de 10 e 30 mg/mL respectivamente (GRÁFICO 8B). Os demais valores não foram estatisticamente significativos.

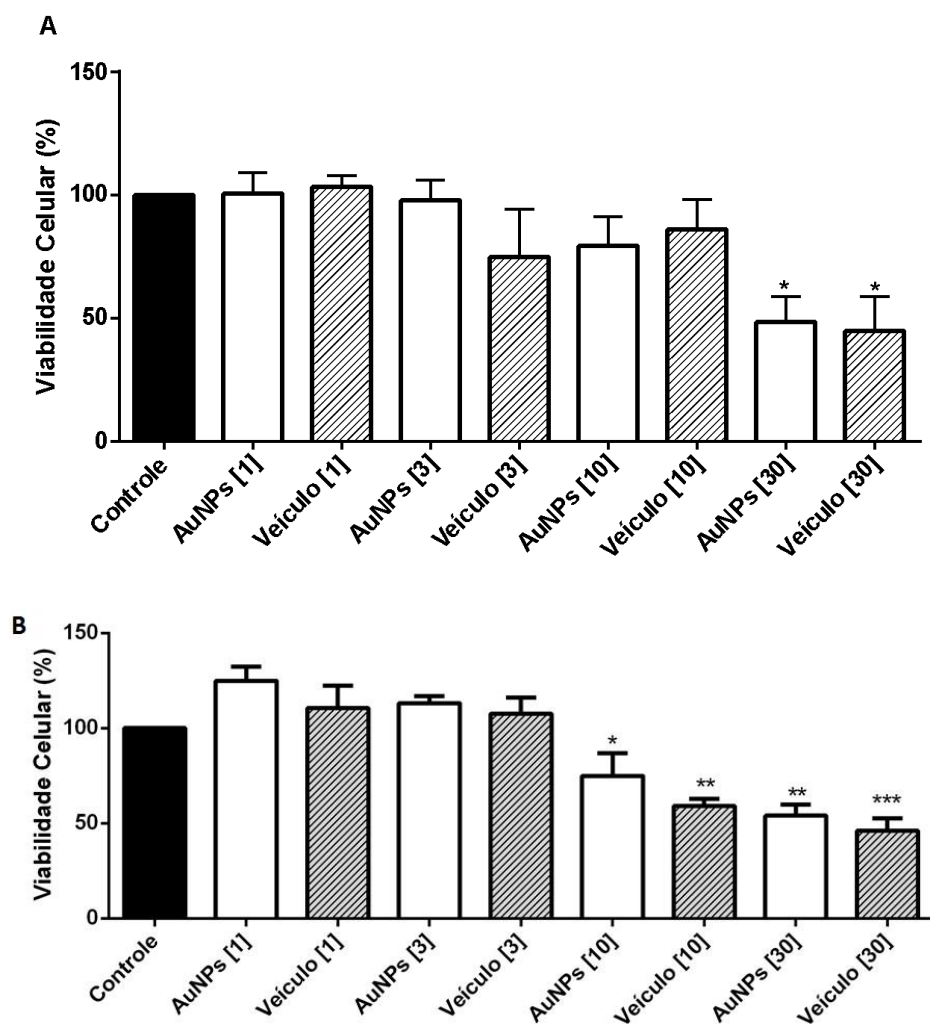


GRÁFICO 8 - Viabilidade celular de queratinócitos HaCaT pelos métodos do MTT (A) e Vermelho Neutro (B) no período de 24 horas de incubação com AuNPs de 10 nm e citrato de sódio (veículo) nas concentrações de 1, 3, 10 e 30 mg/mL. Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Newman Keuls quando F foi significativo. Dados expressos em média da % de Viabilidade celular (n=9). * quando $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle.

4.5 EFEITO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO NA PROLIFERAÇÃO CELULAR DOS QUERATINÓCITOS HACAT

Após a obtenção dos resultados ensaio de viabilidade celular, foi retirada a maior concentração (30 mg/mL) e adicionada a concentração de 0,3 mg/mL na curva, uma vez que a partir de 10 mg/L não houve alteração na viabilidade celular, pelo ensaio de MTT. Através do teste de proliferação celular, avaliou-se a capacidade das dispersões de AuNPs de 10 nm de diâmetro nas concentrações de 0,3, 1, 3 e 10 mg/mL, e seus respectivos veículos, de aumentar a proliferação celular. Todos os tratamentos foram diluídos em meio DMEM suplementado com 0,05% de SFB para verificar se ocorreria um aumento da proliferação e DMEM suplementado com 10% SFB para verificar se ocorreria uma possível redução da proliferação.

O teste de aumento da proliferação pela metodologia do MTT indicou que não houve alteração significativa na proliferação celular dos queratinócitos após 72 h em contato com as dispersões de AuNPs e citrato de sódio nas concentrações testadas, conforme gráfico 9A.

Já no teste de inibição da proliferação, foi notada uma redução em 14% na proliferação celular dos queratinócitos após 72 h em contato com as dispersões de citrato de sódio da concentração de 10 mg/mL (GRÁFICO 9B), sendo os demais valores não considerados estatisticamente significativos.

Através desses testes de quantificação da proliferação celular, pode-se verificar que as diferentes concentrações de AuNPs abaixo de 10 mg/mL não foram capazes de promover aumento ou redução da proliferação dos queratinócitos, assim como seus respectivos veículos.

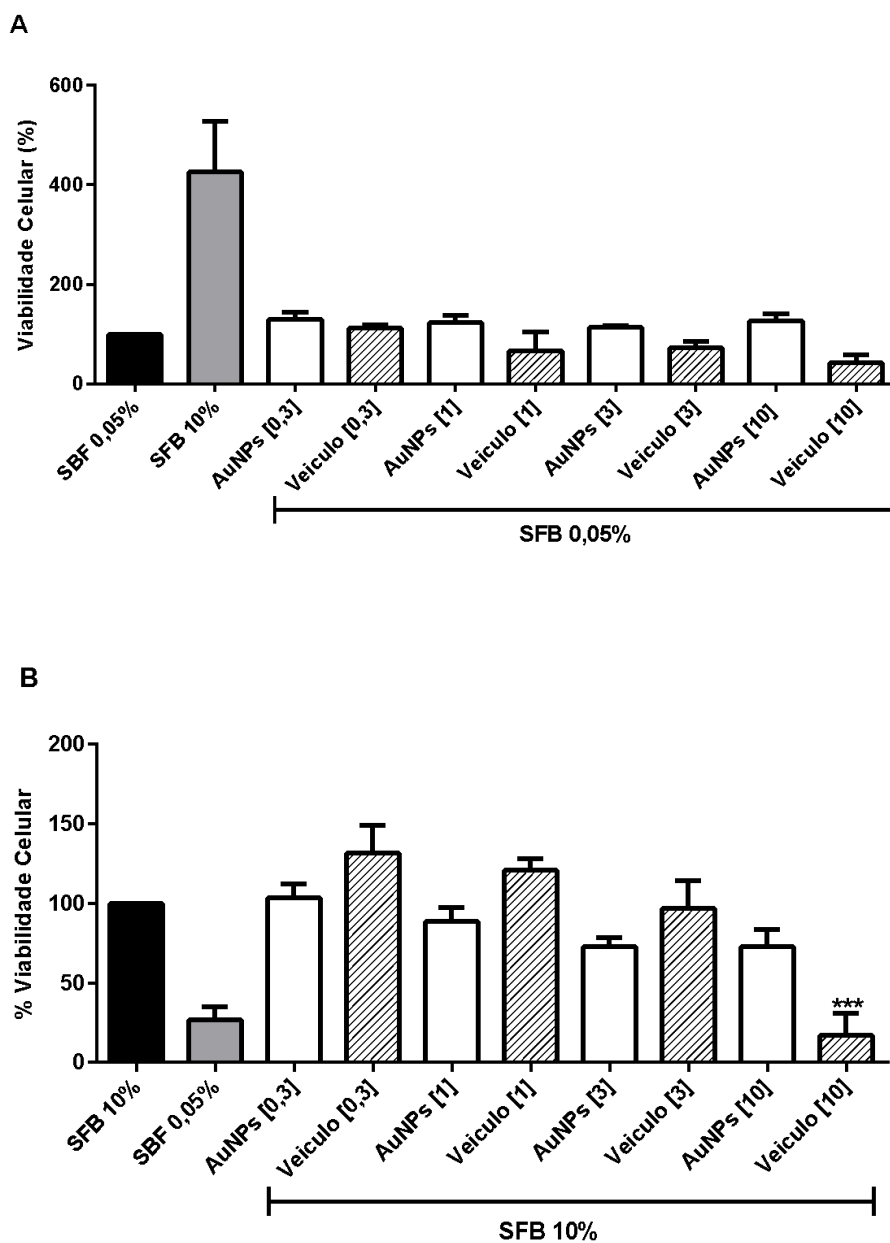


GRÁFICO 9 - Efeito das AuNPs no aumento (A) e na inibição (B) da proliferação de células HaCaT pelo método de MTT por um período de 72 horas de incubação após contato com as dispersões de AuNPs e citrato de sódio, ambos nas concentrações de 0,3, 1, 3 e 10 mg/mL diluídas em meio 0,05% de SFB por 72 horas. Os dados foram analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Newman Keuls quando F foi significativo. Dados expressos em média da % de Viabilidade celular (n=12). * quando $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle.

5 DISCUSSÃO

A nanotecnologia vem trazendo, ao longo dos anos, novos focos para prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças com base nas propriedades das nanopartículas (PANYALA, PEÑA-MENDEZ e HAVEL, 2009). O ouro tem sido utilizado na medicina há centenas de anos, por várias civilizações (BHATTACHARYA *et al.*, 2007). Alguns medicamentos contendo ouro já obtiveram sucesso na terapia contra sífilis, tuberculose, lúpus eritematoso, artrite e reumatismo (PANYALA, PEÑA-MENDEZ e HAVEL, 2009). Devido a sua estabilidade, o ouro se tornou o material de escolha para muitas aplicações da nanotecnologia (HUTCHINGS, BRUST e SCHMIDBAUR, 2008).

Os tratamentos disponíveis para a psoríase focam no controle da inflamação crônica por meio de tratamentos tópicos, fototerapia, imunossupressão sistêmica (por meio dos fármacos ciclosporina e metotrexato) e imunobiológicos. Essas terapias apresentam problemas com efeitos adversos e eficácia, que não excede 80%, uma vez que os tratamentos tópicos não atingem as células efetoras eficientemente (PROSPERI *et al.*, 2017). Tendo isso em vista, o potencial das AuNPs para o tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias gerou um grande interesse no estudo da sua atividade anti-inflamatória para o tratamento de doenças como a psoríase (BROWN ET AL., 2007).

Neste trabalho, foi utilizado o modelo da aplicação múltipla de TPA na orelha de camundongos, já que a resposta inflamatória intensa se assemelha a de algumas doenças cutâneas, sendo possível verificar alguns parâmetros da inflamação: edema, infiltrado celular e espessura epidérmica através da proliferação celular (YOUNG, WAGNER e SPIRES, 1983). O edema é causado pelo fluxo de fluído rico em proteínas, resultante da ação dos leucotrienos, histamina, bradicinina e componentes do complemento, que aumentam a permeabilidade dos capilares e vênulas. Essa alteração tem como objetivo permitir a entrega de anticorpos e proteínas para o local da lesão (SHERWOOD, 2004). Em relação ao edema de orelha induzido nos camundongos, os resultados demonstraram que o tratamento com as AuNPs não reduziu a formação do edema em nenhuma das concentrações testadas topicamente (0,1% e 0,3% em creme) e pela via intraperitoneal (3 mg/Kg). No entanto, apesar de o edema ser um parâmetro do estudo por si só, não é determinante para indicar um possível efeito anti-inflamatório ou não.

A avaliação do efeito das AuNPs sobre a atividade das enzimas MPO e NAG é indicativo de como as AuNPs podem estar modulando a resposta imunológica no tecido inflamado. Nos ensaios realizados, verificou-se que nenhum dos tratamentos com AuNPs foi capaz de alterar a atividade das enzimas, porém o tratamento com citrato de sódio 0,024% em creme promoveu um aumento significativo na atividade da MPO, indicando provavelmente que o agente redutor (veículo) utilizado para a síntese das AuNPs poderia aumentar a migração de neutrófilos para o tecido, contribuindo, assim, para a persistência da inflamação.

Através da histologia, observou-se que as AuNPs 0,1% em creme não causaram alterações significativas no infiltrado celular e na espessura da epiderme. Em contrapartida, as AuNPs 0,3% e o citrato de sódio 0,024% em creme promoveram um aumento tanto do infiltrado celular como da espessura epidérmica. Este resultado permite confirmar o aumento na atividade da MPO pelo citrato de sódio 0,024% em creme. Já o resultado observado pela AuNPs 0,3% em creme pode ser o efeito do veículo citrato de sódio sobre o tecido inflamado, uma vez que ele por si só já aumenta significativamente os parâmetros analisados.

Os dados encontrados corroboram os resultados obtidos por Durocher e colaboradores (2017) que investigaram o efeito das AuNPs de 20 nm nos neutrófilos e verificaram aumento na produção de quimiocinas e na indução da migração *in vitro* e *in vivo*. Esses autores mostraram que as AuNPs induzem a infiltração leucocitária e aumentam a produção de citocinas locais, apresentando atividades pró-inflamatórias.

Já alguns estudos demonstraram o oposto. Tsai e colaboradores (2007) induziram artrite reumatoide em ratos e observaram uma diminuição da inflamação, com redução dos escores histológicos, densidade microcapilar, infiltração leucocitária (macrófagos) e dos níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β após tratamento com AuNPs de 13 nm com aplicação intra-articular. Dohnert e seus colaboradores (2012) avaliaram o potencial anti-inflamatório e de sinergismo das nanopartículas através de um modelo animal de tendinite, em que associaram AuNPs e diclofenaco utilizando corrente direta (iontoforese), observando uma redução dos níveis de IL-1 β e TNF- α neste modelo.

No grupo tratado com AuNPs via intraperitoneal observou-se redução significativa da espessura da epiderme, sendo que não houve alteração no infiltrado celular, indicando que mesmo causando redução na espessura epidérmica em

relação ao grupo veículo creme, ainda assim, há presença de células inflamatórias e de exsudato inflamatório.

Para avaliar se as AuNPs apresentariam efeitos diretos nas células da epiderme, os queratinócitos, foram realizados testes *in vitro*. Através deles foi possível observar que não houve alteração na viabilidade celular dos queratinócitos HaCaT nas concentrações de 1 e 3 mg/mL de AuNPs de 10 nm de diâmetro e nos seus respectivos veículos, nas diferentes metodologias utilizadas. A concentração de 10 mg/mL e seu respectivo veículo não promoveu redução significativa no ensaio de MTT, porém foi capaz de reduzir a viabilidade no ensaio de Vermelho Neutro. Já a concentração de 30 mg/mL e seu veículo reduziram significativamente a viabilidade dos queratinócitos em ambas as metodologias e por isso foi excluída dos ensaios de proliferação.

Nos ensaios de proliferação realizados, foram testadas as concentrações de 0,3; 1; 3 e 10 mg/mL de AuNPs. Não foi possível observar efeitos das AuNPs tanto no aumento como na inibição da proliferação celular dos queratinócitos HaCaT nas condições testadas. Existem vários trabalhos publicados mostrando interferência das AuNPs no processo de proliferação de diferentes células. Lu e colaboradores (2010) observaram que AuNPs de 34 nm aumentaram a proliferação celular de queratinócitos de linhagem primária em baixas concentrações (5.0 e 10.0 ppm). No trabalho de Pernodet et al. (2006), AuNPs de 14 nm na concentração de 0,8 mg/ml reduziram a proliferação celular de linhagens primárias de fibroblastos através da modificação das fibras de actina, presentes no citoesqueleto, que auxiliam no crescimento, migração e diferenciação celular. Da mesma forma, Bhattacharya et al. (2004) demonstraram a capacidade das AuNPs de 67 nm inibirem a proliferação de células endoteliais humanas (HUVEC) induzidas por VEGF-165, ao se ligarem diretamente ao fator de crescimento ligado a heparina e impedir sua sinalização.

Na literatura relacionada às AuNPs existem dados que, muitas vezes, podem parecer controversos, porém, é necessário levar em consideração a existência de extensa variação em relação ao tamanho das nanopartículas utilizadas nos diferentes estudos e, conseqüentemente, variação na concentração de agente redutor utilizado, o que pode levar a resultados completamente distintos. Como foi possível observar, um aumento na concentração de citrato levou a um aumento no infiltrado leucocitário local no modelo de edema por TPA e aumento na espessura

epidérmica. Portanto, o tamanho da nanopartícula utilizada nos estudos, alteram os resultados obtidos, e possivelmente a utilização de outros tamanhos em novos testes resultaria em diferentes dados.

6 CONCLUSÃO

As AuNPs com diâmetro médio de 10 nm, formato esférico e estáveis quando em dispersão coloidal, não foram capazes de promover redução do edema de orelha crônico, induzido por TPA, da atividade das enzimas MPO e NAG e do infiltrado celular nas concentrações testadas pela via tópica em creme (0,1% e 0,3%) e na dose de 3 mg/Kg administrada pela via intraperitoneal.

Nos ensaios *in vitro*, foi demonstrado que as concentrações de 1, 3 e 10 mg/mL de AuNPs e seus respectivos veículos não promoveram alteração na viabilidade celular e não alteraram a proliferação celular em queratinócitos HaCaT.

Assim, podemos finalizar este estudo afirmando que nestas condições as AuNPs podem não ser eficazes para o tratamento de doenças inflamatórias da pele.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFIFI, T.; GANNES, G.; HUANG, C.; ZHOU, Y. Topical therapies for psoriasis: evidence-based review. **Canadian Family Physician**, v. 51, p. 519-25, 2005

AINSWORTH, C. A many layered thing. **Nature**, v. 492, p. 552-554, 2012.

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5 ed. Editora Artmed, 2010.

ALKILANY, A. M.; MURPHY, C. J. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? **Journal of nanoparticle research: an interdisciplinary forum for nanoscale science and technology**, v. 12, p. 2313-33, 2010.

BHATTACHARYA, R.; PATRA, C. R.; VERMA, R.; KUMAR, S.; GREIPP, P. R.; MUKHERJEE, P.. Gold Nanoparticles Inhibit the Proliferation of Multiple Myeloma Cells. **Advanced Materials**, v.19, p. 711–716, 2007.

BHOSLE, M. J.; KULKARNI, A.; FELDMAN, S. R.; BALKRISHNAN, R. Quality of life in patients with psoriasis. **Health and Quality of Life Outcomes**, v. 4, p. 1-7, 2006.

BOUWSTRA, J. A., HONEYWELL-NGUYEN, P. L., GOORIS, G. S., PONEC, M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. **Progress in Lipid Research**, v. 42, p. 1-36, 2003.

BROWN, C. L.; BUSHELL, G.; WHITEHOUSE, M. W.; AGRAWAL, D. S.; TUPE, S. G.; PAKNIKAR, K. M.; TIEKINK, E. R. T. Nanogold- pharmaceuticals. **Gold Bulletin**, v. 40, p. 245-250, 2007.

BURNS, T.; BREATHNACH, S.; COX, N.; GRIFFITHS, C. **Rook's Textbook of Dermatology**, Volume 1, Eighth Edition, Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 2010.

CHEN, Y.; GU, X.; NIE, C. -G.; JIANG, Z. -Y.; XIE, Z. -X.; LIN, C. -J. Shape controlled growth of gold nanoparticles by a solution synthesis. **Chemical Communications**, v. 33, p. 4181-4183, 2005.

CHITHRANI, B. D.; GHAZANI, A. A.; CHAN, W. C. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. **Nano letters**, v. 6, p. 662-668, 2006.

CHONG, B. F.; WONG, H. K. Immunobiologics in the treatment of psoriasis. **Clinical Immunology**, v, 123, n. 2, p. 129-138, 2007.

COHEN, S. N.; BARON, S. E.; ARCHER, C. B. Guidance on the diagnosis and clinical management of psoriasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 1, p. 13-18, 2012.

CONNOR, E. E.; MWAMUKA, J.; GOLE, A.; MURPHY, C. J.; WYATT, M. D. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. **Small**, v. 1, p. 325- 327, 2005.

DENNING, M. F. Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 7, p. 1141-1146, 2004.

DE WALL, S. L.; PAINTER, C.; STONE, J. D.; BANDARANAYAKE, R.; WILEY, D. C.; MITCHISON, T. J.; STERN, L. J.; DEDECKER, B. S. Noble metals strip peptides from class II MHC proteins. **Nature Chemical Biology**, v. 2, p. 197- 201, 2006.

DE YOUNG, L. M.; KHEIFETS, J. B.; BALLARON, S. J; YOUNG, J. M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents and Actions**, v. 26, p. 335-341, 1989.

DI MEGLIO, P.; VILLANOVA, F., NESTLE, F. O. Psoriasis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, p. 1-30, 2014.

DOHNERT, M. B.; VENÂNCIO, M.; POSSATO, J. C.; ZEFERINO, R. C.; DOHNERT, L. H.; ZUGNO, A. I.; DE SOUZA, C. T.; PAULA, M. M. S.; LUCIANO, T. F. Gold nanoparticles and diclofenac diethylammonium administered by iontophoresis reduce inflammatory cytokines expression in Achilles tendinitis. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 1651-1657, 2012.

DUROCHER, I.; NOEL, C.; LAVASTRE, V.; GIRARD, D. Evaluation of the in vitro and in vivo proinflammatory activities of gold (+) and gold (-) nanoparticles. **Inflammation Research**, v. 66, p. 981-992, 2017.

FERNANDES, R.; SMYTH, N. R.; MUSKENS, O. L.; NITTI, S.; HEUER-JUNGEMANN, A.; ARDERN-JONES, M. R.; KANARAS, A. G. Interactions of skin with gold nanoparticles of different surface charge, shape, and functionality. **Small**, v. 11, n. 6, 713–721, 2015.

FILON, F. L.; CROSER, M.; ADAMI, G.; BOVENZI, M.; ROSSI, F.; MAINA, G. Human skin penetration of gold nanoparticles through intact and damaged skin. **Nanotoxicology**, v. 5, p. 493 – 501, 2011.

FUCHS, E.; RAGHAVAN, S. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. **Nature Reviews. Genetics**, v. 3, p. 199-209, 2002.

GREB, J. E.; GOLDMINZ, A. M.; ELDER, J. T.; LEBWOHL, M. G.; GLADMAN, D. D.; WU, J. J.; MEHTA, N. N.; FINLAY, A. Y.; GOTTLIEB, A. B. Psoriasis. **Nature Reviews**, v. 2, n. 16082, p. 1-17, 2016.

GUDJONSSON, J. E.; KARASON, A.; ANTONSDOTTIR, A.; RUNARSDOTTIR, E. H.; HAUKSSON, V. B.; UPMANYU, R.; GULCHER, J.; STEFANSSON, K.; VALDIMARSSON, H. Psoriasis patients who are homozygous for the HLA-Cw*0602 allele have a 2.5-fold increased risk of developing psoriasis compared with Cw6 heterozygotes. **The British Journal of Dermatology**, v. 148, n. 2, p. 233-235, 2003.

HENGLEIN, A.; GIERSIG, M. Formation of Colloidal Silver Nanoparticles: Capping Action of Citrate. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 44, p. 9533-9539, 1999.

HUTCHINGS, G. J.; BRUST, M.; SCHMIDBAUR, H. Gold - an introductory perspective. **Chemical Society Reviews**, v. 37, p. 1759-1765, 2008.

HSU, Y. C.; LI, L.; FUCHS, E. Emerging interactions between skin stem cells and their niches. **Nature Medicine** v. 20, n. 8, p. 847 - 856, 2014.

JAIN, P.K., HUANG, X., EL-SAYED, I.H., EL-SAYED, M.A. Review of some interesting surface plasmon resonance-enhanced properties of noble metal nanoparticles and their applications to biosystems. **Plasmonics**, v. 2, p. 107-118, 2007.

JANA, N. R.; GEARHEART, L.; MURPHY, C. J. 2001. Seeding Growth for Size Control of 5-40 nm Diameter Gold Nanoparticles. **Langmuir**, v. 17, p. 6782-6786, 2001.

JOBLING, R. G. Psoriasis -- a preliminary questionnaire study of sufferers' subjective experience. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 1, p. 233-236, 1976.

KOSTER, M. I.; ROOP, D. R. Genetic pathways required for epidermal morphogenesis. **European Journal of Cell Biology**, v.83, p. 625-629, 2004.

LI, W.; SUN, X.; WANG, Y.; NIU, G.; CHEN, X.; QIAN, Z.; NIE, L. In vivo quantitative photoacoustic microscopy of gold nanostar kinetics in mouse organs. **Biomedical Optics Express**, v. 5, p.2679–2685, 2014.

LLEVOT, A.; ASTRUC, D. Applications of vectorized gold nanoparticles to the diagnosis and therapy of cancer. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 242–257, 2012.

LOWES, M. A.; SUÁREZ-FARINÃS, M.; KRUEGER, J. G. Immunology of Psoriasis. Annual **Reviews Immunology**, v. 32, p. 227-255, 2014.

LU, S.; XIA, D.; HUANG, G.; JING, H.; WANG, Y.; GU, H. Concentration effect of gold nanoparticles on proliferation of keratinocytes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, p. 406-411, 2010.

MIRONAVA, T.; HADJIARQYRON, M.; SIMON, M.; JURUKOVSKI, V.; RAFAILOVICH, M. H. Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: effect of size, concentration and exposure time, **Nanotoxicology**, v. 4, p. 120-137, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUKHERJEE, P.; BHATTACHARYA, R.; WANG, P.; WANG, L.; BASU, S.; NAGY, J. A.; ATALA, A.; MUKHOPADHYAY, D.; SOKER, S. Antiangiogenic Properties of Gold Nanoparticles. **Clinical Cancer Research**, v. 11, p. 3530-3534, 2005.

MURPHY, G.; REICH, K. In touch with psoriasis: topical treatments and current guidelines. **Journal of European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 4, p. 3-8, 2011.

ODOBASIC, D.; KITCHING, A. R.; HOLDSWORTH, S. R. Neutrophil-Mediated Regulation of Innate and Adaptive Immunity: The Role of Myeloperoxidase. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, p. 1-11, 2016.

OSAKI, F.; KANAMORI, T.; SANDO, S.; SERA, T.; AOYAMA, Y. A Quantum Dot Conjugated Sugar Ball and Its Cellular Uptake. On the Size Effects of Endocytosis in the Subviral Region. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, p. 6520-6521, 2004.

OTUKI, M. F.; REIS, R. C.; CABRINI, D.; PRUDENTE, A. S.; HORINOUCI, C. D.; CORRER, C. J. Patient-reported outcomes in psoriasis research and practice. **The British Journal of Dermatology**, v. 165, p. 1361-1362, 2011.

PANYALA, N. R.; PEÑA-MENDEZ, E. M.; HAVEL, J. Gold and nano-gold in medicine: overview, toxicology and perspectives. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 7, p. 75-91, 2009.

PARISI, R.; SYMMONS, D. P. M.; GRIFFITHS, C. E. M.; ASHCROFT, D. M. Global Epidemiology of Psoriasis: A Systematic Review of Incidence and Prevalence. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, p. 377-385, 2013.

PASPARAKIS, M.; HAASE, I.; NESTLE, F. O. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, p. 1-13, 2014.

PEDERSEN, D. B.; DUNCAN, S. Substituent effects on the adsorption of dialkyl sulfides on gold nanoparticles. **The Journal Physical Chemistry Annual**, v. 15, p. 11172–11179, 2005.

PEDERSEN, M. O.; LARSEN, A.; PEDERSEN, D. S.; STOLTENBERG, M.; PENKOWA, M. Metallic gold reduces TNF α expression, oxidative DNA damage and pro-apoptotic signals after experimental brain injury. **Brain Research**, v. 1271, p.103–113, 2009.

PEREIRA, G. K.; DI MEGLIO, P.; NESTLE, F. O. Psoriasis. **The Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 7, p. 385-422, 2012.

PEREIRA, M. K. **Ressonância de Plasmon de Superfície Localizado e Espalhamento Raman em Soluções Coloidais de Ouro**. 108 f. Dissertação (Mestrado em Física) – Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, 2009.

PERNODET, N.; FANG, X.; BAKHTINA, A.; ULMAN, A.; RAFAILOVICH, M. Effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts. **Small**, v. 2, p. 766–773, 2006.

PHILIP, D. Synthesis and spectroscopic characterization of gold nanoparticles. **Spectrochimica acta Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 71, p. 80-85, 2008.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JENSEN, J-M. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v. 17, p. 1063-1072, 2008.

PROSPERI, D.; COLOMBO, M.; ZANONI, I.; GRANUCCI, F. Drug nanocarriers to treat autoimmunity and chronic inflammatory diseases. **Seminars in Immunology**, v. 17, 1-7, 2017.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J.L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, p. 1125-1131, 2008.

RITCHILIN, C. T.; COLBERT, R. A.; GLADMAN, D. D. Psoriatic Arthritis. **The New England Journal of Medicine**, v. 376, p. 957-970, 2017.

SAHOO, S. K; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, p. 20-31, 2007.

SARACENO, R.; CHIRICOZZI, A.; GABELLINI, M.; CHIMENTI, S. Emerging applications of nanomedicine in dermatology. **Skin Research and Technology**, v. 19, p. 13–19, 2013.

SHERWOOD, E. R. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, p. 385-405, 2004.

SILVER, F. H.; FREEMAN, J. W.; DEVORE, D. Viscoelastic properties of human skin and processed dermis. **Skin Research and Technology**, v. 7, p. 18–23, 2001.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA (SBD). Consenso brasileiro de psoríase 2012: Guias de avaliação e tratamento **Sociedade Brasileira de Dermatologia**, 2 ed. Rio de Janeiro, 2012.

STANLEY, P. L.; STEINER, S.; HAVENS, M.; TRAMPOSCH, K. M. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Skin Pharmacology: the official journal of the Skin Pharmacology Society**, v. 4, p. 262-271, 1991.

SUMBAYEV, V. V.; YASINSKA, I. M.; GARCIA, C. P.; GILLILAND, D.; LALL, G. S.; GIBBS, B. F.; BONSALL, D. R.; VARANI, L.; ROSSI, F.; CALZOLAI, L. Gold nanoparticles downregulate interleukin-1 β -induced pro-inflammatory responses. **Small**, v. 3, p. 472-477, 2013.

TSAI, C. Y.; SHIAU, A. L.; CHEN, S. Y.; CHEN, Y. H.; CHENG, P. C.; CHANG, M. Y.; CHEN, D. H.; CHOU, C. H.; WANG, C. R.; WU, C. L. Amelioration of collagen-induced arthritis in rats by nanogold. **Arthritis and Rheumatism**, v. 56, p. 544–554, 2007.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v. 11, p. 55-75, 1951.

VILLASENOR-PARK, J.; WHEELER, D.; GRANDINETTI, L. Psoriasis: evolving treatment for a complex disease. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 79, p.413-423, 2012.

WAGNER, E. F.; SCHONTHALER, H. B.; GUINEA-VINIEGRA, J.; TSCHACHLER, E. Psoriasis: what we have learned from mouse models. **Nature Reviews Rheumatology**, v.6, p. 704–714, 2010.

WANG, S.; LU, W.; TOVMACHENKO, O.; RAI, U. S.; YU, H.; RAY, P. C. Challenge in understanding size and shape dependent toxicity of gold nanomaterials in human skin keratinocytes. **Chemical Physics Letters**, v. 463, p. 145 – 149, 2008.

YANG, H - J.; YANG, K - C. Impact of psoriasis on quality of life in Taiwan. **Dermatologica Sinica**, v.33, p. 146-150, 2015.

YOUNG, J. M.; WAGNER, B. M.; SPIRES, D. A. Tachyphylaxis in 12-O-Tetradecanoylphorbol Acetate- and Arachidonic Acid-Induced Ear Edema. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 80, p. 48-52, 1983.